



Caracterización funcional del gen responsable de la
Epilepsia Autosómica Dominante Lateral Temporal,
LGI1, en modelos animales vertebrados.



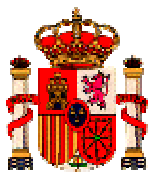
INSTITUTO DE
BIOMEDICINA
DE VALENCIA

Memoria para optar al grado de
Doctora en Biología presentada por

Ana Gorostidi Pagola

Directores: Dr. Jordi Pérez-Tur
Dr. Juan José Poza

Donostia, Septiembre 2006



MINISTERIO DE
EDUCACION Y
CIENCIA



CONSEJO SUPERIOR DE
INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

D. Jordi Pérez Tur, Doctor en Biología y Científico Titular del Instituto de Biomedicina de Valencia del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

Certifica:

que **Ana Gorostidi Pagola**, licenciada en Biología por la Universidad de Navarra, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado **“Caracterización del gen causante de la Epilepsia Lateral Temporal Autosómica Dominante, LGI1, en modelos animales vertebrados”**, para la obtención del grado de Doctora en Biología.

Para que conste a todos los efectos, firma la presente certificación en:

Valencia, a 25 de Agosto de 2006

Dr. Jordi Pérez Tur



D. Juan José Poza Aldea, Doctor en Medicina, FEA Neurología Hospital Donostia,

Certifica:

que **Ana Gorostidi Pagola**, licenciada en Biología por la Universidad de Navarra, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado **“Caracterización del gen causante de la Epilepsia Lateral Temporal Autosómica Dominante, LGI1, en modelos animales vertebrados”**, para la obtención del grado de Doctora en Biología.

Para que conste a todos los efectos, firma la presente certificación en:

Donostia, a 25 de Agosto de 2006

Dr. Juan José Poza Aldea

Este trabajo se ha enmarcado dentro del proyecto “Caracterización funcional de Epitempina, el gen responsable de la Epilepsia lateral temporal” financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (número de referencia SAF2002-0060).

Para la realización de esta tesis, la autora ha sido beneficiaria de una “beca Ilundain de investigación neurogenética” concedida por la Fundación Ilundain (Convocatoria 2000) y de una beca para la formación de investigadores, modalidad predoctoral (AE), del Gobierno Vasco (convocatoria 2001).

Agradecimientos

¡Tanto y a tanta gente tengo qué agradecer!. A mis tres jefes: Jordi, Juanjo y Adolfo por todo lo que me han enseñado y por haber confiado en una zoóloga. A toda la Unidad Experimental, a todos los laboratorios por donde he pasado: el de Álvaro, Carlo, Toni y tantos del IBV donde siempre me han acogido bien. A mis compañeros de fatigas y risas de la UGM, a quien les debo este trabajo y todo mi cariño.

Etxeko txiki eta haundiei

Índice general

I. Abreviaturas.....	vii
II. Relación de figuras.....	ix
III. Relación de tablas	xiii

1. Introducción

1.1. Epilepsia	
1.1.1. Terminología	19
1.1.2. Clasificación de crisis y epilepsias	20
1.1.3. Epilepsia como enfermedad genética.....	26
1.1.4. Canales de membrana y epilepsia.....	29
1.2. La Epilepsia Autosómica Dominante Lateral Temporal (ADLTE)	
1.2.1. Cuadro clínico y diagnóstico de	32
1.2.2. Búsqueda del gen causante de ADLTE: ligamiento a 10q24	33
1.3. LGI1	
1.3.1. Identificación de LGI1	37
1.3.2. LGI1 como gen supresor de tumores	37
1.3.3. Expresión de LGI1	39
1.3.4. Estructura de LGI1	42
1.3.5. Análisis de homologías	45
1.3.6. Genes parálogos de LGI1	46
1.3.7. Genes ortólogos de LGI1	47
1.3.8. Mutaciones y polimorfismos en LGI1	48

2. Material y Métodos

2.1. Material biológico	
2.1.1. Muestras humanas.....	53
2.1.2. Cepas bacterianas.....	55
2.1.3. Animales.....	55
2.1.3.1. Ratones	

2.1.3.2. Peces	
2.1.3.3. Ranas	
2.2. Vectores de expresión empleados	56
2.3. Cebadores empleados.....	57
2.4. Extracción de ADN	59
2.4.1. A partir de sangre periférica.....	59
2.4.2. A partir de cola de ratón.....	60
2.5. Extracción de ARN	61
2.6. Extracción de proteínas para electroforesis bidimensional.....	61
2.7. Búsqueda de mutaciones.....	62
2.8. Análisis de segregación de las mutaciones con la enfermedad en las familias y estudio poblacional.....	63
2.9. Análisis genético de las familias ADLTE	63
2.9.1. Marcadores utilizados y condiciones de amplificación.....	63
2.9.2. Construcción de los haplotipos.....	64
2.9.3. Análisis de ligamiento.	64
2.9.4. Estudio de simulación.....	64
2.10. Búsqueda de polimorfismos.....	65
2.10.1. Región codificante de <i>LGI1</i>	65
2.10.2. Región UTR 5' de <i>LGI1</i>	65
2.11. Sistema de clonación.	
2.11.1. Clonación mediante el sistema de Gateway (Invitrogen).....	66
2.11.2. Clonación direccional: por PCR o subclonación.....	67
2.11.3. Mutagénesis dirigida.	68
2.11.4. Electroporación.	69
2.11.5. Purificación de ADN plasmídico.	69
2.12. Generación de ratones genéticamente modificados	
2.12.1. Preparación de las construcciones y microinyección.....	70
2.12.2. Identificación y extracción de ADN	70
2.12.3. Amplificación del transgén por PCR.....	71
2.13. Caracterización de los ratones transgénicos.	
2.13.1. Cuantificación del número de copias de transgén.....	71
2.13.2. Cuantificación de la expresión de ARNm del transgén	73
2.14. Estudio de comportamiento	74
2.14.1. Proveedores y sistemas empleados en los estudios de comportamiento	75
2.14.2. Campo abierto.....	75
2.14.3. Laberinto elevado	76

2.14.4. Fuerza de agarre.....	77
2.14.5. Rota-rod.....	77
2.14.6. Test de Morris.....	78
2.15. Determinación del tiempo de activación del promotor <i>Thy1.2</i>	80
2.16. Análisis de proteínas – electroforesis bidimensional.....	81
2.17. Análisis del nivel de expresión de los genes p75 ^{NTR} , NogoR y Lingo1 en los ratones transgénicos.....	83
2.18. Análisis de la sensibilidad de los ratones transgénicos a los convulsivos AK y PTZ.....	84
2.19. Análisis estadístico.....	85
2.20. Mantenimiento y obtención de embriones de pez cebra.....	86
2.21. Síntesis de sondas ARN.....	86
2.22. Hibridación in situ sobre embriones enteros de <i>D. rerio</i>	86
2.23. Inmunomarcaje sobre embriones enteros de <i>D. rerio</i>	87
2.24. Inhibición de LGI1 en <i>D. rerio</i> por oligos antisentido morfolidos.....	88
2.25. Sobreexpresión de LGI1 en <i>D. rerio</i> .	
2.25.1. Sobreexpresión de LGI1 por ADN.....	88
2.25.2. Sobreexpresión de LGI1 por ARN.....	88
2.26. Microinyección en huevos de pez cebra.....	89
2.27. Obtención y conservación de los ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	90
2.28. Transcripción in vitro de los canales de potasio y de LGI1.....	90
2.29. Inyección de ARN en ovocitos de <i>X. laevis</i>	90
2.30. Registros electrofisiológicos.....	90
2.31. Protocolos experimentales y análisis de datos.....	91
3. Objetivos.....	95
4. Resultados.....	97

Capítulo I

4.1. Selección de gen candidato en la búsqueda del gen causante de ADLTE....	99
4.2. Búsqueda de mutaciones en LGI1 en familias ADLTE.....	99
4.3. Segregación de las mutaciones en las familias ADLTE01 y ADLTE03 y estudio poblacional.....	103
4.4. Análisis de haplotipos en 8 familias con Epilepsia Parcial.....	104
4.5. Análisis de ligamiento a 10q de 6 familias con Epilepsia Parcial.....	110

4.6. Estudio de simulación de cuatro familias con Epilepsia Parcial	111
4.7. Búsqueda de polimorfismos en LGI1	112

Capítulo II

Mus musculus

4.8. Transgénico de sobreexpresión – <i>LGI1</i> silvestre	
4.8.1. Obtención de la construcción pThy-LGI1-w	115
4.8.2. Generación de los ratones transgénicos Thy-LGI1- wt	116
4.8.3. Letalidad en los ratones Thy-LGI1- wt. Análisis de embriones portadores del transgén	116
4.9. Transgénico de sobreexpresión – mutación 01 de <i>hLGI1</i>	
4.9.1. Obtención de la construcción génica Thy-LGI1-01	118
4.9.2. Generación de los ratones transgénicos Thy-LGI1-01	118
4.9.3. Establecimiento de dos líneas y determinación del número de copias del transgén incorporados	119
4.9.4. Análisis de la transcripción del transgén LGI1-01	120
4.9.5. Análisis del comportamiento de los ratones transgénicos Thy-LGI1-01	121
4.9.5.1. Peso	121
4.9.5.2. Campo abierto	122
4.9.5.3. Laberinto elevado	123
4.9.5.4. Fuerza de agarre	124
4.9.5.5. Rota-Rod	125
4.9.5.6. Test de Morris	126
4.9.6. Análisis del efecto de la sobreexpresión de <i>LGI1</i> en otras proteínas ..	128
4.9.6.1. Análisis de la expresión de proteínas concretas por RT-PCR a tiempo real en los ratones Thy-LGI1-01	128
4.9.6.2. Análisis de proteínas totales de cerebro en los ratones Thy- LGI1-01	129
4.9.7. Sensibilidad a la inducción de crisis epilépticas (AK, PTZ)	132

Danio rerio

4.10. Expresión de <i>lgi1</i> en el desarrollo embrionario de <i>D. rerio</i>	137
4.11. Inhibición de <i>lgi1</i> durante el desarrollo embrionario de <i>D. rerio</i>	139
4.11.1. Fenotipo macroscópico tras la inhibición de LGI1 en <i>D. rerio</i>	139

4.11.2. Análisis del efecto de la inhibición de LGI1 en la integridad estructural de <i>Danio rerio</i>	141
4.12. Sobreexpresión de LGI1 en <i>D. rerio</i>	146

Xenopus laevis

4.13. Expresión funcional de <i>LGI1</i> junto con canales de potasio dependientes de voltaje en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	151
5. Discusión	153
6. Conclusiones	173
7. Bibliografía	177

Abreviaturas

ADLTE	Epilepsia Lateral Temporal Autosómica Dominante (Autosomal Dominant Lateral Temporal Epilepsy)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AK	Ácido Kaínico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
cM	centiMorgan
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
EEG	Electroencefalograma
IPG	gradiente del punto isoelectrico
Kb	Kilobase
LB	Medio Luria-Bertani
LOD	<i>Logarithm of the odds</i>
LRR	Repeticiones ricas en Leucina (Leucine-Rich Repeats)
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PTZ	Pentilenetetrazol
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
RT-PCR	PCR mediante transcriptasa inversa
SNP	<i>Single Nucleotide Polimorfism</i>
UTR	Región no traducida (Untranslated Region)
SNC	Sistema nervioso central

Nomenclatura del gen LGI1 en los distintos organismos utilizados:

<u>Organismo:</u>	<u>Gen:</u>	<u>Proteína:</u>
<i>Homo habilis</i>	<i>LGII</i>	LGI1
<i>Mus musculus</i>	<i>Lgi1</i>	Lgi1
<i>Danio rerio</i>	<i>lgi1</i>	lgi1

Relación de Figuras

Figura 1:	Ligamiento original de Ottman y colaboradores.....	34
Figura 2:	Segundo ligamiento de ADLTE a 10q24.	35
Figura 3:	Expresión de <i>LGI1</i> detectada mediante <i>Northern blot</i>	40
Figura 4:	Expresión de <i>Lgi1</i> en cerebro de ratón.	41
Figura 5:	Representación esquemática de la organización exón-intrón de <i>LGI1</i>	44
Figura 6:	Estructura de dominios de <i>LGI1</i>	44
Figura 7:	Arquitectura de dominios de <i>LGI1</i> según Staub y cols.	45
Figura 8:	Esquema de la estrategia para la amplificación y posterior secuenciación de la región UTR5' de <i>LGI1</i>	58
Figura 9:	Clonación de productos de PCR mediante el sistema Gateway.	66
Figura 10:	Representación esquemática de la numeración de los ratones por amputación de dedos.	70
Figura 11:	Análisis de la eficiencia de las dos reacciones TaqMan, Actina y transgén.....	72
Figura 12:	Comparación de la eficiencia de las reacciones GAPDH y <i>LGI1</i>	73
Figura 13:	Campo abierto	76
Figura 14:	Laberinto elevado.	76
Figura 15:	Fuerza de agarre.....	77
Figura 16:	Rota-rod.	78
Figura 17:	Test de Morris.....	79
Figura 18:	Representación de dos ensayos de la prueba visible.....	80
Figura 19:	Comparación de la eficiencia de las reacciones p75 ^{NTR} , NogoR y Lingo1 con GAPDH	83
Figura 20:	Microinyección de cigotos de <i>D. rerio</i>	89
Figura 21:	Esquema del diseño de la técnica de fijación de voltaje utilizada para registrar las corrientes en los ovocitos.	91
Figura 22:	Mutación c.758delC encontrada en la familia ADLTE01.	101
Figura 23:	Mutación c.1420C>T encontrada en la familia ADLTE03.	102
Figura 24:	Análisis de segregación de las mutaciones encontradas en <i>LGI1</i> con la enfermedad llevado a cabo por un ensayo de RFLP	103

Figura 25:	Estructura y haplotipos de las familias con epilepsia parcial analizadas: ADLTE02, 03, 04, 05, 06, 07 y 08.....	105
Figura 26:	Comparación de haplotipos que segregan con la enfermedad en las familias ADLTE01, 03, 06 y 07.....	110
Figura 27:	Representación esquemática de las estructuras que forman la construcción plasmídica pTSC21K-LGI1-wt.....	115
Figura 28:	RT-PCR del transgén GFP en embriones transgénicos (+) y no transgénicos (-) para este gen.....	117
Figura 29:	Digestión de la construcción plasmídica pTSC21K-LGI1-01 con <i>Not I</i> para la obtención del fragmento de microinyección en ratones.	118
Figura 30:	Genotipaje de ratones por PCR.....	119
Figura 31:	Cuantificación relativa de la expresión del transgén Thy-LGI1-01 en Cerebro, hígado y músculo esquelético en ambas líneas de ratones transgénicos, línea 15 (L15) y línea 75 (L75).	121
Figura 32:	Resultados de las pruebas en el campo abierto.	123
Figura 33:	Representación de los resultados de la prueba del laberinto elevado.....	124
Figura 34:	Resultados de la Fuerza de agarre de los miembros anteriores de los ratones para cada grupo. Los datos están dados en gramos.	125
Figura 35:	Resultados de la prueba de Rota-Rod.	125
Figura 36:	Resultados de la prueba de Morris visible.	126
Figura 37:	Resultados de la prueba de Morris espacial.....	127
Figura 38:	<i>Probes 1 y 2</i> del test de Morris.....	128
Figura 39:	Cuantificación relativa del ARNm de p75 ^{NTR} , NogoR y Lingo en cerebro de ratones transgénicos de ambas líneas.	129
Figura 40:	Ensayo de electroforesis bidimensional a partir de proteínas totales de cerebro.....	130
Figura 41:	Representación de los puntos protéicos cuyo análisis estadístico a mostrado una diferencia significativa en el ensayo de electroforesis bidimensional a partir de proteínas totales de cerebro.....	132
Figura 42:	Inducción de crisis por AK (Ácido Kaínico) y PTZ (Pentilenetetrazol)	134
Figura 43:	Alineamiento de la secuencia aminoacídica del clon de la genoteca utilizado para construir las sondas para <i>LGI1</i> y la secuencia de los dos genes <i>lgi1</i> descritos, <i>lgi1a</i> y <i>lgi1b</i>	137

Figura 44:	Patrón de expresión de <i>LGI1</i> en el desarrollo embrionario de <i>D. rerio</i>	138
Figura 45:	Esquema de la estructura de <i>lgi1a</i> con ocho exones según la información de la base de datos Ensembl.....	139
Figura 46:	Fotogramas de un vídeo de dos segundos de duración.	141
Figura 47:	Hibridación in situ con sondas de TH (Tirosin hidroxilasa), Sim1 y Gap43, en embriones de 3dpf inyectados con MO anti- <i>lgi1</i>	143
Figura 48:	Hibridación in situ con sondas de Islet2 y Prox1, en embriones de 3dpf inyectados con MO anti- <i>lgi1</i>	144
Figura 49:	Inmunomarcaje con anticuerpos anti-ACT (alfa-acetil-tubulina) en embriones de 3dpf inyectados con MO anti- <i>lgi1</i>	145
Figura 50:	Inmunomarcaje con anticuerpos anti-Znp1 () en embriones de 3dpf inyectados con MO anti- <i>lgi1</i>	146
Figura 51:	Microinyección de ADN en embriones de <i>D. rerio</i>	147
Figura 52:	Registros electrofisiológicos de la coexpresión de <i>LGI1</i> junto con los canales de potasio dependientes de voltaje <i>KCNQ2</i> , <i>KCNQ3</i> , <i>SH</i> , <i>EAG1</i> y <i>Kv1.2</i>	152

Relación de tablas

Tabla 1:	Clasificación internacional de las crisis epilépticas (ILAE, 1981).....	21
Tabla 2:	Nueva propuesta de clasificación de crisis epilépticas (Lüders <i>et al.</i> , 1998)	23
Tabla 3:	Clasificación de las epilepsias y síndromes epilépticos (ILAE, 1989) ..	24
Tabla 4:	Genes codificantes para canales iónicos y síndromes epilépticos en los que se encuentran implicados.....	31
Tabla 5:	Estructura genómica de <i>LGI1</i>	42
Tabla 6.:	Mutaciones en <i>LGI1</i> en familias con ADLTE. Representación del cambio en el ADN, en el exón-intrón que se produce y el efecto final sobre la proteína.	48
Tabla 7:	Características clínicas de las familias españolas.....	54
Tabla 8:	Características clínicas de las familias alemana e italianas.	55
Tabla 9:	Cebadores y condiciones de PCR para la secuenciación de la región UTR5' de <i>LGI1</i>	57
Tabla 10:	Marcadores microsatélites empleados en el estudio genético de las familias ADLTE.	58
Tabla 11:	Cebadores y su utilización.....	59
Tabla 12:	Cebadores y condiciones de PCR para el rastreo de mutaciones en el gen <i>LGI1</i>	62
Tabla 13:	Condiciones de la PCR para la mutagénesis dirigida.	69
Tabla 14:	Reacción de la PCR a tiempo real.....	72
Tabla 15.:	Condiciones para la PCR a tiempo real.	73
Tabla 16:	Resumen del diseño experimental de la batería de pruebas.	74
Tabla 17:	Ratones empleados para el estudio de comportamiento.....	75
Tabla 18:	Condiciones utilizadas en el electroenfoque ó 1º dimensión de la electroforesis bidimensional.	81
Tabla 19:	Ratones empleados en la inducción de crisis por AK y PTZ.....	85

Tabla 20:	Oligonucleótidos morfolinos utilizados para inhibir la expresión de <i>zLGI1</i> 88
Tabla 21:	Valores de LOD (Z_{\max}) a la frecuencia de recombinación $\theta=0$ de los marcadores estudiados en las seis familias ADLTE analizadas. 111
Tabla 22:	Estudio de simulación en las familias ADLTE04, 06, 07 y 08..... 112
Tabla 23:	Determinación de la expresión del transgén en los embriones transgénicos. 116
Tabla 24:	Cuantificación relativa del n° de copias de transgén incorporado en los ratones transgénicos antes de estabilizar las líneas. El número de copias está dado en media \pm Desviación Estándar. 120
Tabla 25:	Cuantificación relativa del n° de copias de transgén incorporado en los ratones transgénicos después de estabilizar dos líneas. 120
Tabla 26:	Peso de los ratones en el inicio y en el final del total de las pruebas. 122
Tabla 27:	Grupos de ARNm microinyectados en los ovocitos. Los grupos 5, 6 y 7 constan de <i>LGI1</i> junto con los canales de potasio. Los controles para estos tres grupos son los grupos 1, 2, 3 y 4..... 151

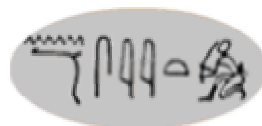
Introducción

"Con la llamada enfermedad sagrada sucede lo siguiente: a mi parecer esta enfermedad tiene tanta relación divina como las otras enfermedades no sagradas [...] El cerebro es el culpable de esta enfermedad [...] Cuando el humor fluye en arterias, pierde el enfermo su voz y le sale espuma de la boca, las manos juntas y agarrotadas, los ojos descajados, los afectados no entienden nada, en algunos casos incluso se producen defecaciones [...] El enfermo pega con los pies a su alrededor [...] Todo esto tiene que soportar el paciente cuando el humor frío fluye en la sangre caliente."

Son palabras de hace 25 siglos escritas por el médico griego Hipócrates quien aseguró por primera vez que la enfermedad se originaba en el cerebro. Son muchos los nombres que la enfermedad recibió a lo largo de los tiempos: enfermedad lunar, enfermedad demoníaca, enfermedad sagrada, indicando cuál fue para cada una de las épocas la etiología de la enfermedad.

Nombre dado a la epilepsia por el antiguo Egipto: **"nesejet"**, que se traduce como "peligro procedente de Dios".

Fuente: H. Schneble, [*Krankheit derungezählten Namen*](#), Huber-Verlag Bern, 1987, p. 9-11



El documento más antiguo que trata de la epilepsia es una tabla babilónica de 2000 AC y una de las descripciones más tempranas de una crisis epiléptica data de hace 3000 años en Mesopotamia. Existen también ejemplos en muchas otras culturas antiguas. La medicina bizantina por ejemplo, da un "remedio" (el hisopo o verbená) y alerta sobre el alcohol como factor desencadenante de crisis epilépticas. Al llegar a la edad media, después de haber dado un salto en la medicina gracias a Hipócrates, se olvidaron sus enseñanzas y la creencia en una etiología divina volvió a resurgir.

La investigación moderna de la etiología de la epilepsia comienza con el trabajo de Pritsch, Hitzing, Ferrier y Caton en 1870. Estos autores llegaron a registrar crisis epilépticas en la corteza cerebral de animales. Desde entonces, lentamente se ha ido avanzando en el diagnóstico, clasificación, tratamiento y esclarecimiento de las causas de esta enfermedad tan compleja, extendida y en la que aún queda tanto por descubrir.

Desde el punto de vista epidemiológico, la epilepsia es una enfermedad común que puede manifestarse a cualquier edad. Su incidencia tiene dos picos, uno en la infancia y adolescencia, y un segundo más acusado por encima de los 60 años. Según la Agencia Internacional para la Epilepsia (IBE) unos 50 millones de personas padecen

epilepsia en todo el mundo de las cuales el 20-30% padecen más de una crisis al mes (Forsgren *et al.*, 2005).

El número de nuevos casos de epilepsia al año a nivel mundial oscila entre 24 y 53 casos/100000 habitantes. En Europa, de los estudios de prevalencia realizados en distintos países y años, se calcula que el número de niños y adolescentes con epilepsia activa es de 0,9 millones, 1,9 millones de personas entre 20 y 64 años y 0,6 millones de mayores de 65 años (Forsgren *et al.*, 2005).

La epilepsia es una condición clínica tratable. Aproximadamente en el 50% de los casos se consigue una remisión temprana de las crisis con el primer tratamiento, en el 25-35% de los casos se logra tras uno o más cambios de tratamiento, dejando un 15-25% de pacientes que son resistentes a las drogas utilizadas. Sin embargo, el coste económico generado por la epilepsia es considerable. En 2001, en España la prestación farmacéutica a través de receta de fármacos antiepilépticos ascendió a 109,11 millones de euros, es decir el 1,36% del gasto total. Esto sólo en cuanto a costes farmacéuticos, a los que habría que sumar el resto de costes médicos directos (consultas, pruebas diagnósticas, ingresos,...), costes médicos indirectos (transporte sanitario, apoyo psicológico, rehabilitador y social,...) y los costes derivados del impacto de la enfermedad en la capacidad laboral productiva del individuo por motivos relacionados con la enfermedad (subempleo, prestaciones de desempleo, pensiones por incapacidad laboral, mortalidad prematura,...) (Pato-Pato *et al.*, 2004).

Sin embargo, a pesar del relativo éxito de los tratamientos, todas las terapias de las que se dispone hoy en día son sintomáticas, es decir, las personas afectadas por epilepsia pueden tomar fármacos que evitan la aparición de las crisis, pero no curan la enfermedad. De hecho, los fármacos de que disponemos actúan frenando la difusión de la descarga epiléptica, pero no impiden la génesis de esta descarga. En la actualidad no existe modo conocido de abolir el problema por completo, ni tampoco de prevenir su aparición, ni siquiera en individuos con alto riesgo conocido de desarrollar crisis (Lees *et al.*, 2000).

Por todo ello, resulta de gran importancia identificar los mecanismos moleculares por los que se produce la epilepsia, a fin de localizar nuevas dianas moleculares que permitan desarrollar fármacos antiepilépticos más efectivos para cada caso, y si fuera posible, desarrollar fármacos que impidan la ictiogénesis.

1.1. Epilepsia.

1.1.1. Terminología.

La Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE), en su Glosario de Terminología Descriptiva publicado en 2001 (Blume *et al.*, 2001) define:

Epilepsias: aquéllas condiciones que implican ataques epilépticos recurrentes crónicos que pueden ser considerados como Síndromes Epilépticos.

Síndrome Epiléptico: Condición neurológica crónica caracterizada por ataques epilépticos recurrentes.

Ataque epiléptico: Manifestación(es) de actividad epiléptica (excesiva y/o hipersíncrona), normalmente autolimitada, de las neuronas en el cerebro.

En otras palabras, podemos decir que la epilepsia es el nombre que se le da a un trastorno cerebral caracterizado predominantemente por interrupciones recurrentes e impredecibles de la función normal del cerebro llamadas ataques epilépticos o crisis epilépticas. (Fisher *et al.*, 2005). Las crisis son cambios en el comportamiento del paciente que se desarrollan bruscamente, terminan espontáneamente y ocurren como respuesta a una actividad eléctrica anormal del cerebro (Gudín, 2000). La actividad cerebral en la epilepsia se caracteriza por descargas neuronales que son excesivas y anormalmente sincronizadas (Blume *et al.*, 2001).

Las epilepsias son un grupo heterogéneo de enfermedades con diversas etiologías que para su estudio se clasifican en síndromes. Se define un síndrome epiléptico como un trastorno epiléptico caracterizado por un conjunto de signos y síntomas que suelen encontrarse juntos y que son manifestaciones de disfunciones cerebrales subyacentes que pueden originarse por muchas causas diferentes (Fisher *et al.*, 2005).

Existe poco consenso en cuanto a una correcta y completa definición de epilepsia y de crisis epiléptica. En 2005 la ILAE y la IBE propusieron un replanteamiento de las definiciones de crisis epiléptica y de epilepsia que en la actualidad están siendo debatidas (Fisher *et al.*, 2005):

Crisis epiléptica: la manifestación transitoria de signos y/o síntomas debido a una anormal (excesiva o sincronizada) actividad en el cerebro.

Epilepsia: enfermedad del cerebro caracterizada por una predisposición duradera a generar ataques epilépticos y por las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales de esta condición. La definición de epilepsia requiere la manifestación de al menos una crisis epiléptica.

En la anterior definición, la existencia de epilepsia venía determinada por la coincidencia de, al menos, dos crisis (crisis recurrentes), sin embargo en la nueva definición para considerar epilepsia sólo se requiere la coexistencia de una crisis y de una predisposición a generarlas. Este aspecto ha sido criticado por varios autores por la dificultad que entraña determinar si realmente existe una predisposición duradera a generar crisis sin la observación de crisis recurrentes (Beghi *et al.*, 2005).

1.1.2. Clasificación de crisis y epilepsias.

Las epilepsias son un grupo muy extenso y heterogéneo de enfermedades las cuales resultan muy difícil de clasificar, sin mencionar las más de 200 enfermedades genéticas en las que la epilepsia es una parte más o menos importante del fenotipo (Steinlein, 2004).

Para diagnosticar correctamente una epilepsia se ha de tener en cuenta el tipo de crisis, la edad de aparición, la etiología, la severidad y recurrencia, el horario de aparición, los factores desencadenantes, los patrones de electroencefalograma (EEG) (intercríticos y críticos, en vigilia y en sueño), los resultados de neuroimagen, la respuesta al tratamiento y el pronóstico (Salas-Puig *et al.*, 2004).

Por tanto, una clasificación de los síndromes epilépticos requiere de antemano de la existencia de una clasificación de las crisis en la que basarse.

Clasificación de las crisis epilépticas:

En 1981 se aceptó una propuesta de clasificación de las crisis epilépticas elaborada por la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE) basándose en la clasificación previa elaborada por Gastaut (Gastaut, 1970). Dicha clasificación, aún vigente, se caracteriza por estar basada en la semiología de las crisis y en las características del electroencefalograma (EEG) durante la crisis (EEG crítico) y durante el periodo entre crisis (EEG intercrítico) (Commission-on-Classification-and-Terminology-of-the-International- *et al.*, 1981).

Como nos muestra la tabla 1 esta clasificación se basa en los siguientes criterios:

Tabla 1. Clasificación internacional de las crisis epilépticas (ILAE, 1981)

Crisis parciales (comienzo focal)
Crisis parciales simples (sin alteración de la conciencia)
Con síntomas motores: con o sin marcha jacksoniana, movimientos versivos, posturales y fonatorios
Con síntomas sensitivos: somatosensitivos, visuales, auditivos, olfatorios, gustativos y vertiginosos
Con síntomas autonómicos: incremento del peristaltismo intestinal, vómito, incontinencia, palpitaciones, palidez, hiperemia, piloerección y midriasis
Con síntomas psíquicos: disfasia, disnésia (p.ej., <i>déjà vu</i>), alteraciones cognitivas (p.ej., delirio epiléptico, distorsión del tiempo), cambios afectivos (p.ej., miedo, angustia), ilusiones (p.ej., macropsia) y alucinaciones complejas (p.ej., autoscopia, escenas)
Crisis parciales complejas (con alteración de la conciencia, generalmente amnesia, afasia y otras agnosias)
Inicio como crisis parcial simple seguido por alteración de la conciencia
Con alteración de la conciencia desde el inicio
Crisis parciales que evolucionan a generalizadas
Parcial simple que evoluciona a generalizada
Parcial compleja que evoluciona a generalizada
Parcial simple con evolución a parcial compleja y a generalizada
Crisis generalizadas (convulsivas y no convulsivas)
No convulsivas
Crisis de ausencias típicas
Crisis de ausencias atípicas
Crisis atónicas
Convulsivas
Crisis mioclónicas
Crisis clónicas
Crisis tónicas
Crisis tonicoclónicas
Crisis atónicas
Crisis no clasificables

- Crisis generalizadas frente a crisis parciales:

Las crisis generalizadas son las que ocurren de una manera bilateral, simétrica y sincrónica y traducen una descarga generalizada de toda la corteza cerebral. Este es un concepto clásico, que se encuentra en revisión. Resulta difícil imaginar que en el mismo momento se activen espontáneamente todas las neuronas de la corteza cerebral. Hoy se piensa más bien que las llamadas epilepsias generalizadas derivan de una disfunción en circuitos tálamo-corticales, especialmente de proyección frontal, y que rápidamente difunden a toda la corteza (Chan *et al.*, 2006). Las crisis generalizadas cursan con pérdida de conciencia con excepción de las crisis mioclónicas (aquellas caracterizadas por contracciones musculares súbitas, involuntarias y cortas). El EEG crítico e intercrítico muestra paroxismos generalizados, la mayoría de las veces sincrónicos y simétricos, y de predominio bifrontal. No es raro encontrar puntas frontales aisladas, lo que apoya la hipótesis de que las llamadas crisis generalizadas constituyen un tipo especial de crisis focales frontales.

Por lo contrario, las crisis parciales traducen una descarga de un grupo de neuronas corticales localizadas en un área determinada. Su semiología dependerá de la funcionalidad del área afectada. El EEG crítico muestra un inicio focal y el EEG intercrítico puede mostrar anomalías en el área correspondiente.

En la práctica esta distinción se hace a veces difícil de aplicar ya que muchas crisis parciales, a pesar de iniciarse en un área localizada, se extienden rápidamente, convirtiéndose en crisis generalizadas muchas veces indistinguible de una crisis generalizada “pura”. En este caso hablamos de generalización secundaria.

- Crisis parciales simples frente a parciales complejas:

Por consenso se definieron como crisis parciales simples a las crisis de inicio focal, sea cual sea su semiología, siempre y cuando el paciente conserve inalterado su nivel de conciencia. Por el contrario, se definieron como crisis parciales complejas cuando se produce una alteración de la conciencia.

Este es probablemente el punto más controvertido de esta clasificación ya que en la práctica clínica con frecuencia resulta imposible determinar si ha habido alteración de la conciencia durante la crisis (crisis que cursan con afasia o amnesia, o crisis en neonatos). Además, esta clasificación no tiene en cuenta todas las posibilidades de progresión de la crisis y a menudo se observan crisis de un determinado tipo que evolucionan convirtiéndose en otro.

Sin embargo, sin duda el aspecto más criticado es que esta clasificación al estar basada en evidencias electrofisiológicas, asume que existe una correlación uno a uno entre la semiología de la crisis y los hallazgos de EEG críticos e intercríticos, lo cual no siempre es así, especialmente en casos infantiles.

Por esta razón, en 1998 Lüders y otros autores (Luders *et al.*, 1998) propusieron una clasificación alternativa basada exclusivamente en la semiología de las crisis, sin tener en cuenta las características del EEG.

En la nueva clasificación se elimina la dicotomía entre generalizada y parcial, así como entre simple y compleja. Como fuente para la clasificación se utiliza exclusivamente la descripción de la crisis por parte del paciente, por testigos o mediante registros de vídeo. Además, permite establecer una secuencia de fenómenos sucesivos, generando un número indefinido de crisis posibles.

La clasificación surge asumiendo que los síntomas de la crisis dependen de la interferencia de la actividad epiléptica sobre una de las siguientes ‘esferas’: sensorial, consciente, autonómica y motora. Además incluye modificadores de localización: izquierdo/derecho/axial/bilateral asimétrico/generalizado, así como el hemisferio de afectación: izquierdo/derecho.

Por otro lado, distingue entre crisis epiléptica y evento paroxístico (cuando no hay suficientes evidencias para asumir un origen epiléptico), e incluye términos no utilizados en la clasificación anterior como ‘auras’ (síntomas subjetivos que suelen ocurrir al comienzo de la crisis a modo de aviso), ‘crisis dialépticas’ (que cursan con alteración de la conciencia) y crisis ‘automotoras’, ‘hipermotoras’ e ‘hipomotoras’. En la tabla 2 se resumen los puntos principales de esta clasificación.

Tabla 2: Nueva propuesta de clasificación de crisis epilépticas (Lüders *et al.*, 1998)

Auras (somatosensitivas, auditivas, olfatorias, abdominales, visuales, gustativas, autonómicas, psíquicas)
Crisis autonómicas (vegetativas)
Crisis dialépticas (asociadas con desconexión del entorno o amnesia)
Crisis motoras
Simples (mioclónicas, espasmos, tonicoclónicas, tónicas, clónicas y versivas)
Complejas (hipermotoras, automotoras, gelásticas)

Tabla 2 (continuación): Nueva propuesta de clasificación de crisis epilépticas (Lüders *et al.*, 1998)

Crisis especiales (atónicas, hipomotoras, astáticas, acinéticas, afásicas, mioclono negativo)
Eventos paroxísticos
En la clasificación semiológica de las crisis también se consideran los parámetros de localización siguientes
Izquierdo, derecho, localización somatotópica (p. ej., brazo izquierdo, pie derecho)
Axial, bilateral asimétrico, generalizado
Hemisferio izquierdo, hemisferio derecho

Clasificación de las Epilepsias y los Síndromes Epilépticos:

La clasificación de epilepsias y síndromes epilépticos más extendida fue aceptada por la ILAE en 1985 (Commission-on-Classification-and-Terminology-of-the-International- *et al.*, 1985) y modificada ligeramente en 1989 (Commission-on-Classification-and-Terminology-of-the-International-League-Against-Epilepsy, 1989)(tabla 3). Está basada en la diferenciación entre síndromes generalizados, síndromes focales o relacionados con una localización, síndromes indeterminados y síndromes especiales. Dentro de cada categoría distingue tres grupos:

- **Síndromes sintomáticos:** existe una etiología conocida causante de las crisis.
- **Síndromes idiopáticos:** no existe otra enfermedad que la propia epilepsia, es decir, no existe otra causa determinante que no sea una propensión de origen genético de la corteza cerebral a generar crisis epilépticas.
- **Síndromes criptogénicos:** se sospecha una causa sintomática pero no puede ser determinada.

Tabla 3. Clasificación de las epilepsias y síndromes epilépticos (ILAE, 1989)

Síndromes generalizados				
Idiopáticos				
Convulsiones neonatales familiares benignas				
Convulsiones neonatales benignas				
Epilepsia mioclónica benigna del lactante				
Epilepsia con ausencias infantil				
Epilepsia con ausencias juvenil				
Epilepsia mioclónica juvenil				
Epilepsia con crisis gran mal del despertar				
Otras epilepsias generalizadas idiopáticas				
Epilepsia con crisis provocadas por estímulos específicos				
Criptogénicos o sintomáticos				
Síndrome de West				
Síndrome de Lennox-Gastaut				
Epilepsia con crisis mioclónico-astáticas (síndrome de Doose)				
Epilepsia con ausencias mioclónicas				
Sintomáticos				
Etiología inespecífica				
Encefalopatía mioclónica precoz				
Encefalopatía epiléptica infantil precoz con patrón de supresión (síndrome de Ohtahara)				
Otras epilepsias generalizadas sintomáticas				
Etiología específica				
Numerosas causas metabólicas o degenerativas pueden incluirse en este apartado (p. ej., epilepsias mioclónicas progresivas)				
Síndromes focales o relacionados con una localización				
Idiopáticos				
Epilepsia benigna infantil con paroxismos centrotemporales				
Epilepsia benigna infantil con paroxismos occipitales				
Epilepsia primaria de la lectura				
Criptogénicos				
Sintomáticos				
Epilepsia parcial continua (síndrome de Kojewnikow)				
Epilepsia del lóbulo temporal				
Epilepsia del lóbulo frontal				
Epilepsia del lóbulo parietal				
Epilepsia del lóbulo occipital				

Tabla 3 (continuación): Clasificación de las epilepsias y síndromes epilépticos (ILAE, 1989)

Síndromes indeterminados (con crisis parciales y crisis generalizadas)
Crisis neonatales
Epilepsia mioclónica-severa
Epilepsia con punta-onda continua durante el sueño
Epilepsia con afasia adquirida (síndrome de Landau-Kleffner)
Síndromes especiales
Convulsiones febriles
Crisis provocadas por un factor tóxico o metabólico
Crisis aisladas; estado de mal aislado

En 1997 la ILAE constituyó un Grupo de Trabajo para la Clasificación y Terminología compuesto por epileptólogos de diferentes partes del mundo con el objetivo de mejorar las clasificaciones existentes aplicando los conocimientos actuales.

Este grupo de trabajo no ha propuesto una nueva clasificación. En su lugar en 2001 (Engel, 2001) propusieron un esquema diagnóstico basado en cinco ejes, aplicable a cada paciente a modo de protocolo para la identificación de cada síndrome epiléptico.

Para la aplicación de estos ejes elaboraron un Glosario de Terminología Descriptiva para la Semiología de las Crisis (Blume *et al.*, 2001) para estandarizar la terminología y facilitar así la comunicación y la uniformidad, así como una lista los Tipos de Crisis y Estímulos Desencadenantes, que consideraron entidades diagnósticas en sí mismas, y una lista abierta de Síndromes Epilépticos Establecidos incluyendo condiciones que cursan con crisis epilépticas que no requieren un diagnóstico de epilepsia.

1.1.3. Epilepsia como enfermedad genética.

Contrariamente a la creencia popular que durante siglos denominó a la epilepsia “enfermedad sagrada” atribuyéndole un papel sobrenatural, muchas veces demoníaco, ya en los escritos hipocráticos se la consideraba “ni más divina ni sagrada que cualquier otra enfermedad”, no sólo afirmando “que tiene una causa natural” sino llegando a considerar que “su origen, como en otras enfermedades, reside en la herencia” (Hipócrates 470-410 A.C.). Sin embargo, durante mucho tiempo se consideró la epilepsia como una enfermedad no genética probablemente debido a que

crisis esporádicas o recurrentes pueden ser causadas por numerosos factores como daño cerebral adquirido (traumatismos, isquemia, tumores), alteraciones del metabolismo o malformaciones congénitas. En estas epilepsias denominadas “síntomáticas” según la clasificación de la ILAE, una causa (no genética) puede atribuirse con relativa facilidad como la responsable. Sin embargo, alrededor del 1% de la población desarrolla crisis recurrentes sin razón obvia y sin la presencia de ninguna anormalidad neurológica; son las llamadas epilepsias idiopáticas (Steinlein, 2004).

El carácter hereditario de las epilepsias fue inicialmente sugerido por la observación de la agregación familiar, es decir, que con frecuencia los parientes de enfermos de epilepsia se encuentran también afectados de este mal.

El riesgo de padecer epilepsia se incrementa de 2 a 4 veces en los parientes de primer grado de personas con epilepsias idiopáticas o criptogénicas (Epilepsias en las que se sospecha un origen sintomático pero no se puede probar) comparando con la población general. Sin embargo, muchas personas con epilepsia no tienen familiares afectados. En un estudio de la Universidad de Columbia se recogió la historia familiar de 1957 personas con epilepsia. La proporción de sujetos con una historia familiar de epilepsia (uno o más parientes de primer grado afectados) fue del 15% para las epilepsias idiopáticas generalizadas y del 12% para epilepsias criptogénicas focales. Por otra parte muy pocas familias mostraban un patrón de herencia mendeliano (Ottman, 2005).

En estas familias en las que la historia familiar es inconsistente con una herencia Mendeliana los siguientes dos efectos genéticos podrían jugar un papel. Algunas epilepsias esporádicas (sin historia familiar) pueden ser causadas por mutaciones *de novo* (como se ha visto en la Epilepsia Mioclónica Infantil Severa en el gen *SCN1A*). Otras epilepsias podrían ser causadas por mutaciones somáticas en regiones críticas del cerebro (Ottman, 2005).

Otros estudios que aportaron evidencia de la existencia de factores genéticos en la epilepsia fueron los realizados sobre series de gemelos en las que se ha encontrado mayor tasa de concordancia de epilepsia en gemelos monozigóticos (MZ) que en dizigóticos (DZ). En un estudio de 1998 (Berkovic *et al.*, 1998) las tasas de concordancia encontradas fueron mayores en MZ que en DZ tanto en epilepsias generalizadas (82% vs 26%) como en parciales (36 vs 5%), aunque las tasas en el caso de las generalizadas fueron mayores en ambos tipos de gemelos.

Pronto se aceptó ampliamente una etiología genética en las epilepsias generalizadas, sin embargo las epilepsias focales o parciales han seguido atribuyéndose hasta hace relativamente poco a factores ambientales como daños en el nacimiento, infecciones, traumatismo craneal postnatal, o lesiones cerebrales (tumores o daño vascular) (Andermann *et al.*, 2005). En 1969, Loiseau y Beaussart con un trabajo en el que estudiaron 53 pacientes de epilepsia, concluyeron que la epilepsia parcial hereditaria no existe. De hecho, mientras que la idea de que las epilepsias generalizadas, en las que se produce una descarga masiva y sincronizada en todo el córtex cerebral, son frecuentemente heredadas es fácil de aceptar, la herencia de un síndrome focal no lo es tanto ya que resulta difícil entender cómo un defecto genético que en teoría se está expresando en todo el cerebro de forma simétrica puede causar una crisis parcial (Berkovic *et al.*, 1999).

La existencia de una historia familiar en pacientes con epilepsia parcial ha tenido tradicionalmente varias explicaciones. En primer lugar puede ocurrir por azar. Al menos 1 de cada 20 individuos tendrá una crisis de tipo epiléptico en algún momento de sus vidas, y esta frecuencia es aplicable también a los familiares de los enfermos de epilepsia. (Hauser *et al.*, 1993). En segundo lugar, se ha llegado a pensar que existe una predisposición basal a la epilepsia que sí es heredable, aunque la aparición del síndrome depende de otros factores externos adquiridos pre o postnatalmente (Berkovic and Scheffer, 1999). Por otra parte, familias con varios miembros afectados pueden ser la consecuencia de exposición compartida a factores ambientales o a patrones comunes de comportamiento (como la dieta), y no de factores genéticos.

Hoy en día sabemos que tanto las epilepsias generalizadas como las parciales pueden estar determinadas genéticamente y que claramente el riesgo de padecer epilepsia está incrementado en los parientes de los afectados. Pero, como lo demuestran los estudios en gemelos, se ha visto que este riesgo es mayor en el caso de las epilepsias generalizadas que en las parciales (Ottman *et al.*, 1998).

Como ocurre en otras enfermedades comunes, muchos de los síndromes epilépticos, tanto generalizados como parciales, se pueden explicar con un modelo de herencia multifactorial o compleja, en el que varios genes contribuyen cada uno con un pequeño efecto que por sí sólo es incapaz de producir el fenotipo. Por añadidura, factores ambientales también pueden jugar un papel importante (Risch, 2000). En estos casos la concordancia entre el genotipo y el fenotipo es relativamente débil comparado con los trastornos monogénicos. Los síndromes epilépticos más comunes

suelen ser poligénicos o genéticamente complejos, prefiriéndose este último término ya que incluye las influencias ambientales (Tan *et al.*, 2004).

Aunque representan un porcentaje pequeño dentro del total de epilepsias, los síndromes monogénicos han cobrado una gran importancia a la hora de dilucidar los mecanismos moleculares responsables de la epilepsia. Aunque no está exenta de dificultades la identificación del gen causante, resulta relativamente más sencilla que en los casos de herencia compleja. De hecho, las mejores claves nos vienen de familias relativamente raras, pero con una herencia marcada y donde la epilepsia es transmitida con una herencia mendeliana (Kullmann, 2002).

Estrictamente hablando, la presencia de un alelo mutante debería ser suficiente para provocar la manifestación del fenotipo epiléptico. Sin embargo, los estudios muestran que la penetrancia de estas mutaciones normalmente no es del 100% y que la edad de inicio y la severidad del fenotipo es variable entre familias. Esto indica que la expresión de genes implicados en epilepsia puede ser modulada por genes adicionales sin identificar y posiblemente por factores ambientales (Ottman, 2005). Los fenotipos asociados a mutaciones en un mismo gen pueden ser muy variados incluso entre individuos de la misma familia que comparten la misma mutación (como ocurre en la epilepsia general con crisis febriles plus), remarcando la importancia de factores modificadores. Contrariamente, mutaciones en genes diferentes pueden dar lugar a fenotipos indistinguibles. Lo podemos constatar en la epilepsia del lóbulo frontal nocturna autosómica dominante, y en las convulsiones neonatales familiares benignas. Es de resaltar que las subunidades de canales implicadas en estas epilepsias están frecuentemente relacionadas unas con otras, es decir, subunidades de canales afectadas en un tipo de epilepsia forman parte de un mismo canal iónico. (Kullmann, 2002).

1.1.4. Canales de membrana y epilepsia.

La excitabilidad de las neuronas y la comunicación entre ellas dependen de la acción de varios canales iónicos. La característica estructural básica de estos canales es que constituyen un poro que atraviesa la membrana plasmática y que deja pasar selectivamente distintos iones según el tipo de canal. Los poros no sólo controlan el tipo de ión que puede atravesarlos, sino también la dirección en la que los iones son transportados (hacia el interior o hacia el exterior celular). Los canales iónicos pueden alterar rápidamente la permeabilidad de la membrana para ciertos iones y la concentración de éstos a ambos lados de la membrana puede consiguientemente

determinar el cambio de un potencial basal a un potencial de acción. (Steinlein, 2004). Estos canales se abren y cierran, algunos en respuesta a neuromedidores sinápticos (canales dependientes de ligando) y otros en respuesta a cambios en el voltaje en sí mismo (canales dependientes de voltaje).

Dado que una crisis epiléptica consiste en una descarga sincronizada de un grupo de neuronas y que la descarga resulta de la despolarización del potencial de membrana, es fácil imaginar que mutaciones en este tipo de canales resultarán en una alteración de la excitabilidad neuronal, lo que puede llevar, en determinadas circunstancias, a una situación de descargas recurrentes y sincronizadas y a una crisis epiléptica. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que un incremento de la excitabilidad no es sinónimo de crisis, ya que este incremento en la excitabilidad puede darse en neuronas de tipo inhibitorio. Además, la epilepsia se puede describir como un fenómeno de circuito y las crisis son posibles porque el cerebro está organizado en una serie de redes de neuronas interconectadas. El resultado final de las crisis debido al cambio en la excitabilidad dependerá pues del tipo de neuronas afectadas y de la localización de las mismas. (Turnbull *et al.*, 2005).

Las canalopatías, es decir, las mutaciones en la estructura y en la función de los canales iónicos, pueden ser causa, tanto de las epilepsias idiopáticas, generalizadas y parciales, como de las adquiridas. En todos los casos, se trata de síndromes con una herencia autosómica dominante o de síndromes esporádicos causados por mutaciones *de novo* en heterozigosis. El término “canalopatía” fue utilizado por primera vez por Hoffman en 1995 (Hoffman, 1995) al estudiar enfermedades musculares con sintomatología paroxística. De hecho, las canalopatías están implicadas en enfermedades neurológicas episódicas como ataxia episódica, migraña o distonías paroxísticas.

En el momento de inicio de esta tesis, todos los síndromes epilépticos para los cuales se había llegado a identificar un defecto molecular causante correspondían a este grupo, con lo que el único mecanismo del que se disponía de evidencias para explicar la patología epiléptica era la alteración de la excitabilidad neuronal por el funcionamiento erróneo de estos canales. En la actualidad se conocen 15 genes que codifican para estos canales, mutaciones en los cuales causan diferentes síndromes epilépticos (tabla 4). Entre ellos, encontramos genes en canales iónicos excitadores (canales de Na⁺, Ca²⁺ y en el receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 4\beta 2$) y en canales iónicos inhibidores (canales de K⁺, receptores de GABA y canales de Cl⁻) (Turnbull *et al.*, 2005). Además hay dos genes, *LGI1* y *EFHC1* (Suzuki *et al.*, 2004), que no codifican para canales iónicos, pero que podrían estar relacionados con éstos.

Tabla 4: Genes codificantes para canales iónicos y síndromes epilépticos en los que se encuentran implicados.

Gen	Síndromes	Cromosoma
Canal de Sodio		
SCN2A	BFNIS (MIM 607745), GEFS + (MIM 604233)	2q23-q24.3
SCN1B	GEFS + 1 (MIM 604233)	19q13.1
SCN1A	GEFS + 2 (MIM 604233), SMEI (607208)	2q24
Canal de Calcio		
CACNB4	IGE (MIM 600669), JME (MIM 606904)	2q22-23
CACNA1A	EA2 (MIM 108500), FHM (MIM 141500), SCA6 (MIM 183086), IGE (MIM 600669)	19q
CACNA1H	CAE (MIM 607682)	16p13.3
Receptor de Acetilcolina		
CHRNA4	ADNFLE1 (MIM 6000513)	20q13.2-q13.3
CHRNA2	ADNFLE3 (MIM 605375)	1p21
Canal de Potasio		
KCNQ2	BFNC1 (MIM 125370), BFNC/myokymia (MIM 606437)	20q13.3
KCNQ3	BFNC2 (MIM 121201)	8q24
KCNA1	EA1 (MIM 160120), epilepsia parcial	12p13
Receptor GABA		
GABRA1	JME (MIM 606904)	5q34
GABRG2	GEFS + 3 (MIM 604233), CAE (MIM 607681)	5q34
GABRD	GEFS + (MIM 604233)	1p36.3
Canal de Cloro		
CLCN2	CAE (MIM 607682), EGMA (MIM 607628)	3q26

BFNIS, crisis neonatales e infantiles benignas familiares; IGE, epilepsia generalizada idiopática; EA, ataxia episódica; FHM, migraña hemipléjica familiar; SCA, ataxia espinocerebelar; BFNC, convulsiones neonatales familiares benignas; EGMA, epilepsia con crisis gran mal del despertar; JME, epilepsia mioclónica juvenil; GEFS+, epilepsia generalizada con crisis febriles plus; ADNFLE, epilepsia frontal nocturna autosómica dominante

1.2. La Epilepsia Lateral Temporal Autosómica Dominante.

1.2.1. Cuadro clínico y diagnóstico.

Tradicionalmente la Epilepsia del lóbulo temporal se ha considerado como un síndrome adquirido a consecuencia de una lesión previa normalmente de origen mesial. Mucho más rara es la epilepsia lateral o neocortical temporal, generalmente en relación con lesiones corticales, la cual junto con la epilepsia mesial suele ser de mala evolución y con mala respuesta al tratamiento. Aparte de estas epilepsias mesiales y laterales temporales sintomáticas, existen otras idiopáticas, generalmente transmitidas con un patrón autosómico dominante con penetrancia incompleta. Berkovic y cols (Berkovic *et al.*, 1996) describieron una serie de familias con epilepsia mesial temporal autosómica dominante con neuroimagen normal, con escaso número de crisis y buena respuesta al tratamiento antiepiléptico.

Por otra parte, las epilepsias laterales temporales familiares si bien son clínicamente muy similares, presentan en unos casos un patrón de herencia autosómico dominante mientras en otros no muestran un patrón de herencia tan claro. Los fenotipos de las familias con ADLTE (*Autosomal Dominant Lateral Temporal Epilepsy*) descritas hasta la fecha, aunque con cierta variabilidad, se caracterizan por las crisis escasas y de tipo parcial simple precedidas por un aura de componente principalmente auditivo y frecuente generalización secundaria, edad de inicio juvenil-adulto y buena respuesta a antiepilépticos comunes. Los casos en los que los estudios electrofisiológicos y de neuroimagen revelaron anormalidades sitúan el foco epiléptico en la región lateral del lóbulo temporal, cerca de la unión temporo-occipital (Winawer *et al.*, 2000), lo cual concuerda con el componente auditivo con el que cursan la mayoría de las crisis.

En el trabajo de Ottman (Ottman *et al.*, 1995) se sugiere el nombre de Epilepsia Parcial Temporal Autosómica Dominante con Síntomas Auditivos (ADPEAF) mientras que Poza y colaboradores (Poza *et al.*, 1999) hablan de Epilepsia Lateral Temporal Autosómica Dominante (ADLTE). En ambos casos, los síntomas auditivos o la localización lateral la distinguen de la otra epilepsia del lóbulo temporal, más común, denominada Epilepsia Temporal Mesial descrita por el grupo de Berkovic, que cursa con crisis parciales con síntomas psíquicos y autonómicos (Berkovic *et al.*, 1996).

1.2.2. Búsqueda del gen causante de ADLTE: Ligamiento a 10q24.

En 1995, Ottman y colaboradores publicaron un estudio genético realizado sobre una familia americana en la que individuos en tres generaciones sucesivas presentaban una epilepsia parcial con un patrón de herencia autosómico dominante que no correspondía a ningún síndrome reconocido en la clasificación propuesta por la ILAE (Ottman *et al.*, 1995).

Diecisiete miembros de esta familia habían sufrido crisis, aunque tan sólo en 14 se consideraron como crisis de tipo epiléptico. En tres casos la epilepsia se asoció a una lesión o enfermedad previa, reduciendo a once los casos de epilepsia que se consideró idiopática/criptogénica. En seis de estos casos los individuos presentaron alteraciones de tipo auditivo como aura previa a la crisis parcial. Junto a este componente auditivo, el fenotipo se caracterizaba por presentar una edad de inicio juvenil (8-19 años), una frecuencia de crisis muy baja y una buena respuesta a antiepilépticos comunes. En ningún caso se observó actividad anormal en los EEG intercríticos.

Sobre esta familia realizaron un estudio de ligamiento asumiendo una penetrancia del 71%. En un primer rastreo, de 110 marcadores tipo microsatélite, obtuvieron evidencias de ligamiento al cromosoma 10 en el marcador D10S222 (valor de LOD 2,69 a $\theta=0,00$). Para tratar de refinar los resultados se seleccionaron 12 marcadores en la región cercana a D10S222, encontrando un valor de LOD máximo de 3,99 para el marcador D10S192 (Figura 1).

Los diez afectos vivos en el momento del estudio compartían un mismo haplotipo para siete de los marcadores contiguos analizados (del D10S200 al D10S2005), lo que acotó la región mínima a 10 cM.

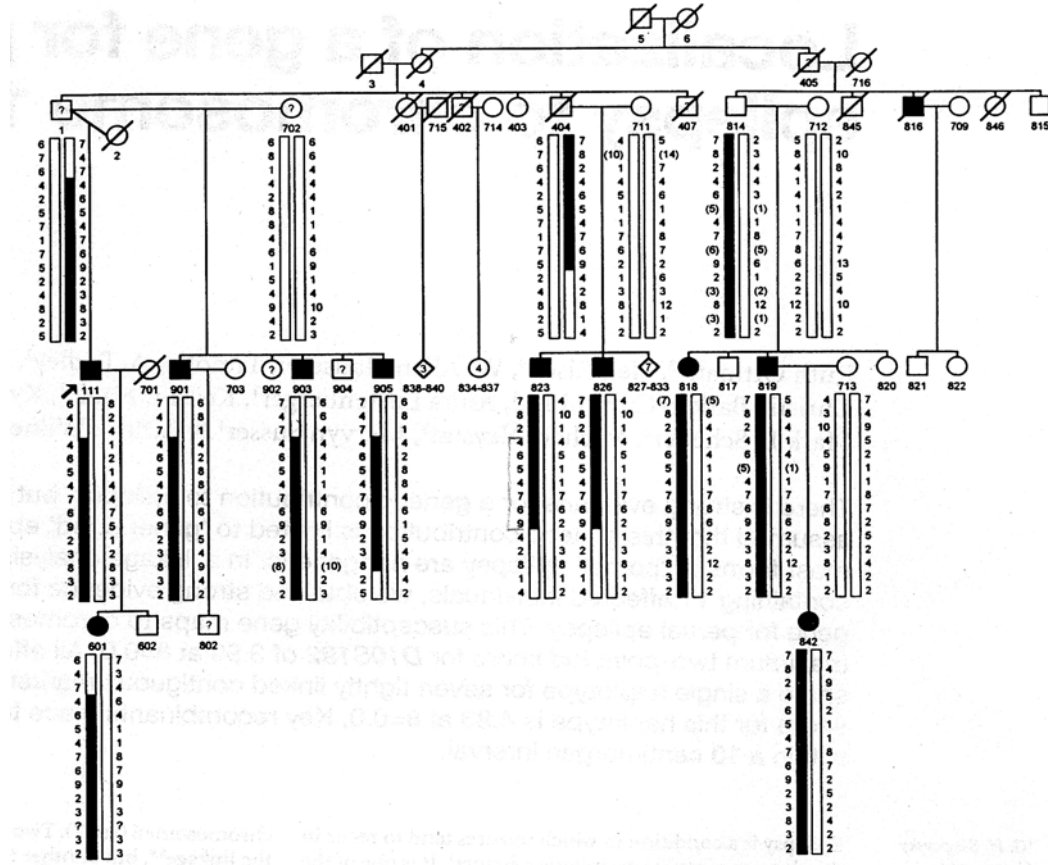


Figura 1: Ligamiento original de Ottman y colaboradores. Familia americana sobre la que se encontró el primer ligamiento de ADLTE a la región 10q24. El haplotipo mínimo fue de 10cM. Publicado en (Ottman *et al.*, 1995).

En 1999, en un estudio llevado a cabo en el País Vasco por el Dr. Poza y colaboradores (Poza *et al.*, 1999), se describía una gran familia vasca en la que individuos de cinco generaciones (Figura 2) presentaban un síndrome epiléptico de características muy similares al de la familia en el trabajo de Ottman. Once de los diecinueve afectados estuvieron disponibles para ser examinados, observándose una edad de inicio variable entre los 11 y los 40 años. Siete de los afectados habían sufrido crisis parciales simples con generalización secundaria; en dos casos las crisis fueron parciales complejas también con generalización secundaria y en un caso las crisis fueron generalizadas. El componente de las auras fue visual (destellos, colores, luces o

formas simples) en cinco casos y auditivo (zumbidos o ruido de maquinaria) en tres. Los pacientes presentaban una frecuencia de crisis baja (3-6/año) ocurriendo frecuentemente durante las primeras horas de sueño y una buena respuesta a antiepilépticos comunes, aunque en algunos casos se observó reaparición de crisis al retirar el tratamiento. En siete casos los pacientes sufrieron dolor de cabeza tras la crisis aunque en ningún caso estupor postcrítico.

El análisis de los EEG intercríticos reveló actividad epiléptica en el área temporo-occipital izquierda en dos casos de los siete estudiados. Otras pruebas de neuroimagen fueron normales en todos los casos.

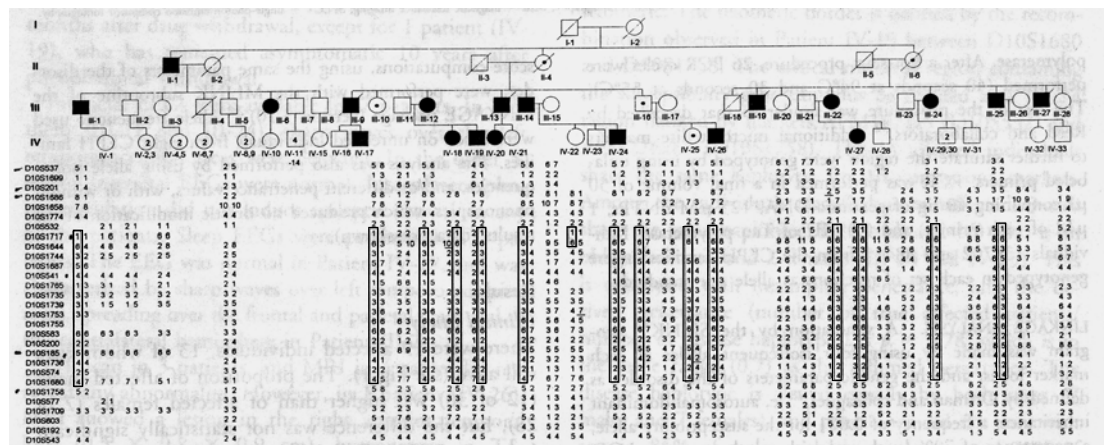


Figura 2: Segundo ligamiento de ADLTE a 10q24. Familia vasca sobre la que se encontró ligamiento de ADLTE a la región descrita previamente en 1995. EL haplotipo mínimo acotado fue de 15cM. Publicado en (Poza *et al.*, 1999).

Al realizar un estudio genético utilizando marcadores de la región acotada por Ottman en 1995 en la familia americana, encontraron evidencias de ligamiento al marcador D101756 con un valor de LOD 1,70 a $\theta=0,0$. Para refinar la zona de ligamiento seleccionaron un total de 29 marcadores en esa región alcanzando un máximo valor LOD de 3,50 y 3,42 a $\theta=0,0$ en los marcadores D10S1680 y D10S1644 respectivamente. Los once individuos afectados compartían el mismo haplotipo de 16 marcadores que también se encontró en tres individuos no afectados poniendo en evidencia la penetrancia incompleta del síndrome. Finalmente, lograron acotar la

región mínima de susceptibilidad en 15cM delimitados por los marcadores D10S532 y D10S1758.

Solapando los haplotipos mínimos descritos en este estudio y en el estudio de Ottman sobre la familia americana, se puede reducir la región de localización del gen de susceptibilidad en una región mínima de 3cM flanqueado por los marcadores D10S1783 y D10S1758.

Estudios posteriores describieron otras familias de fenotipo más o menos similar con crisis parciales principalmente con componente auditivo y frecuente generalización secundaria. En el año 2000, Michelucci y colaboradores describieron una familia italiana, demasiado pequeña para lograr ligamiento estadísticamente significativo, pero en la que se encontró un haplotipo compartido exclusivamente por los afectados dentro de la región mínima de 3cM (Michelucci *et al.*, 2000).

En el mismo año se describió una familia alemana en la que se encontraron indicios de ligamiento a 10q mostrando algunos pacientes patrones anormales de EEG en la región temporo-occipital (Mautner *et al.*, 2000).

En 2002 se describió una familia noruega con epilepsia familiar temporal en la que se encontraron crisis con síntomas auditivos acompañadas en la mayoría de casos de afasia. Los patrones de EEG de algunos afectados mostraron anomalías en la región temporo-occipital y en la región frontotemporal. A pesar de que el fenotipo de esta familia presentaba algunas diferencias con los descritos anteriormente lograron establecer ligamiento al cromosoma 10 sin conseguir reducir la región mínima de 3cM (Brodtkorb *et al.*, 2002).

Además de la familia americana original, el grupo de Ottman, utilizando como criterio de búsqueda la alta incidencia de síntomas auditivos, lograron identificar cuatro nuevas familias con epilepsia parcial familiar con un fenotipo compatible con el de la familia original y el resto de familias descritas hasta ese momento. En tres de ellas lograron establecer un ligamiento positivo en la región crítica de 3cM, pero la ausencia de sucesos de recombinación les impidió reducirla (Winawer *et al.*, 2002).

1.3. LGI1.

1.3.1. Identificación de LGI1.

Es sabido que en el desarrollo de tumores cerebrales malignos se hallan implicadas múltiples alteraciones genéticas. Frecuentemente, estos acontecimientos suponen la pérdida de función de un gen supresor de tumores, lo cual puede ocurrir como resultado de una mutación o reordenamiento de la estructura cromosomal. Estudios citogenéticos y moleculares han demostrado que la pérdida de una copia completa del cromosoma 10 es el evento más frecuente en gliomas de alto grado. En el 80% de los glioblastomas multiforme se ha demostrado un reordenamiento y pérdida de al menos alguna parte de la segunda copia del cromosoma 10, especialmente en la región 10q23-26 (Bigner *et al.*, 1990)

El glioblastoma multiforme es el tumor maligno más común en el sistema nervioso central adulto. La mayoría se desarrollan rápidamente sin que existan evidencias de la presencia de un precursor maligno, denominándose glioblastomas primarios o *de novo*. La esperanza de vida en estos casos es muy baja, no superando normalmente los tres meses.

En 1998 el grupo de Chernova y colaboradores se encontraba tratando de identificar genes implicados en la aparición y progresión de glioblastomas en esta región del cromosoma 10. Analizando la línea celular de glioblastoma T98G — línea celular que carece de una copia completa del cromosoma 10 y sufre una translocación entre la otra copia del cromosoma 10 y el cromosoma 19 que afecta a la región 10q24, t(10;19), (q24;q13) — lograron aislar utilizando la técnica de clonación posicional un nuevo gen asociado a esta translocación. Lo denominaron *LGI1* (Leucine-rich gene Glioma Inactivated-1) (OMIM: 600512) debido a que codificaba para una proteína con dominios de repeticiones ricas en leucina (Chernova *et al.*, 1998).

1.3.2. LGI1 como gen supresor de tumores.

Desde que el grupo de Cowell propusiera a *LGI1* como un posible supresor de tumores, diferentes estudios posteriores han aportado resultados algo contradictorios.

En primer lugar, mediante el uso de diferentes técnicas, varios grupos han encontrado una reducción en la expresión de LGI1 en gliomas que parece asociada a la gravedad y estado avanzado del tumor, encontrándose niveles algo reducidos en glioblastomas de bajo grado y niveles muy reducidos o nulos en glioblastomas de alto

grado y en líneas celulares de glioblastoma multiforme (Chernova *et al.*, 1998; Krex *et al.*, 2002; Besleaga *et al.*, 2003; Piepoli *et al.*, 2006). Krex y colaboradores, si bien confirmaron los resultados de Chernova y colaboradores al observar una muy reducida o nula expresión de *LGI1* en líneas de glioblastoma, no encontraron evidencias de reorganizaciones cromosómicas en estas líneas que afectaran a *LGI1* (Krex *et al.*, 2002).

Además de las aberraciones cromosómicas, otros mecanismos comúnmente asociados a la inactivación de genes supresores de tumores son la presencia de mutaciones en la secuencia codificante y el silenciamiento del gen debido a cambios en el estado de metilación del ADN genómico. A juzgar por las investigaciones realizadas, ninguno de estos dos mecanismos parece jugar un papel en la reducción de los niveles de ARNm de *LGI1* asociado a glioblastoma (Somerville *et al.*, 2000; Krex *et al.*, 2002). Aún así, la reducción en los niveles de ARNm de *LGI1* asociada al estado del glioma se ha confirmado a nivel de proteína (Besleaga *et al.*, 2003).

El grupo de Steinlein ha propuesto una explicación alternativa al hecho de encontrar niveles variables de expresión de *LGI1* en muestras de tumores primarios y niveles nulos en la mayoría de líneas celulares estudiadas. Teniendo en cuenta que la fuente principal de *LGI1* en el cerebro son las células neuronales, una pérdida gradual de las neuronas durante la progresión hacia una mayor malignidad, podría ser una explicación plausible para la baja o nula expresión de *LGI1* en gliomas de alto grado. Estos autores argumentan por lo tanto que la ausencia de expresión de *LGI1* en glioblastomas podría representar un efecto secundario más que un acontecimiento causal (Gu, Brodtkorb *et al.*, 2005).

Otra aproximación experimental para el estudio de los genes supresores de tumores es la re-expresión forzada del gen en células tumorales que han perdido la expresión del mismo. En caso de tratarse de un gen supresor de tumores, la re-expresión del gen debería reducir el fenotipo tumoral disminuyendo la proliferación y/o la capacidad invasiva de las células. Apoyando esta hipótesis también se han encontrado resultados variables e incluso contradictorios.

Krex y colaboradores estudiaron el efecto de la reintroducción forzada de *LGI1* en dos líneas de glioblastoma con niveles reducidos y en dos líneas con niveles no detectables del gen endógeno. Ninguna de las 4 líneas infectadas mostró diferencias significativas en la capacidad proliferativa, el número de células en fase S del ciclo celular o la migración (Krex *et al.*, 2002).

Un año más tarde, el grupo de Cowell utilizó una estrategia similar y observaron una reducción tanto de la tasa de proliferación como de la capacidad invasiva de las células transfectadas con *LGI1* (Kunapuli *et al.*, 2004). Este mismo grupo propuso una relación entre la inactivación de *LGI1* y la metástasis (Kunapuli *et al.*, 2004).

Recientemente el grupo de Steinlein ha demostrado *in vivo* que la expresión de *LGI1* reduce la agresividad del tumor. Al igual que el grupo de Cowell, atribuyen a *LGI1* un papel en el control de las interacciones célula-matriz extracelular (Piepoli *et al.*, 2006).

1.3.3. Expresión de *LGI1*.

Chernova y colaboradores analizaron el patrón de expresión de *LGI1* a nivel de ARNm en diversos tejidos humanos mediante la técnica de Northern blot (Figura 3). El resultado fue positivo en cerebro y músculo esquelético, siendo la expresión mayoritaria en cerebro. No hubo expresión en corazón, placenta, pulmón, hígado, riñón ni páncreas. La sonda detectó dos transcrito: uno de 2,4kb y otro de 1,6kb. En el caso del cerebro, el transcrito más abundante resultó ser el de 2,4kb mientras que en músculo esquelético ambos transcritos se encontraron por igual (Chernova *et al.*, 1998).

Más adelante, Morante-Redolat y colaboradores observaron, también por Northern blot, tres distintas especies: una banda principal de 2,4kb y dos bandas adicionales, 3,2kb y 1,6kb, de menor intensidad (Morante-Redolat *et al.*, 2002).

Un análisis más detallado de las distintas regiones cerebrales en el trabajo de Chernova reveló una expresión bastante generalizada de los dos transcritos aunque con diferente intensidad según regiones. La expresión máxima se observó en cerebro total, córtex, hipocampo y putamen y la más baja en el *corpus callosum* (Chernova *et al.*, 1998).

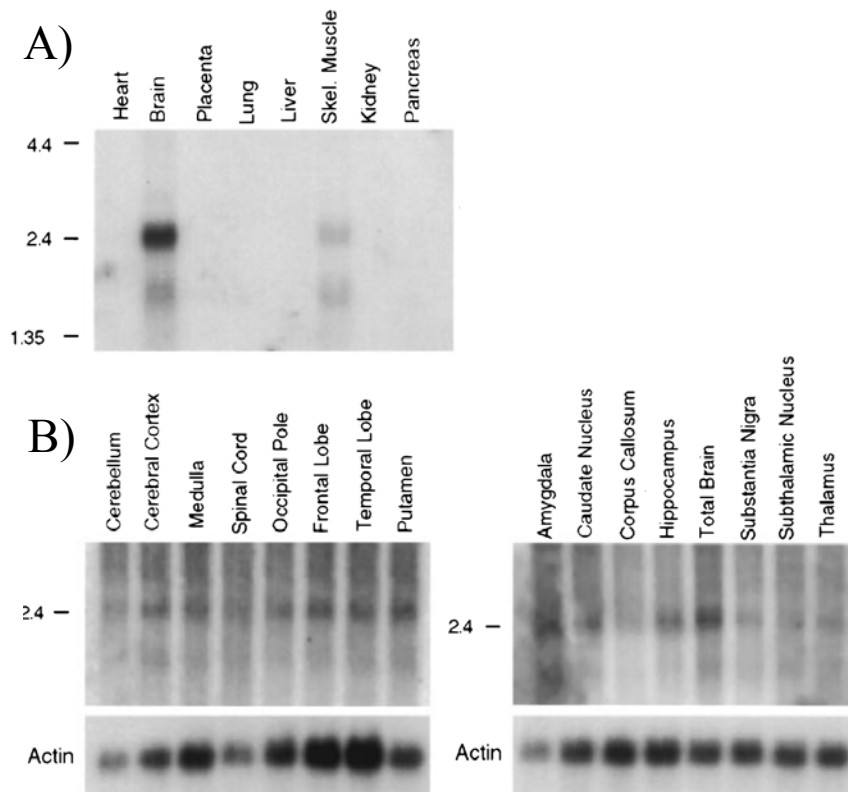


Figura 3: Expresión de *LGI1* detectada mediante *Northern blot*. A) Expresión en distintos tejidos. B) Expresión en distintas regiones del SNC. Publicado en (Chernova *et al.*, 1998).

Utilizando una técnica de mayor sensibilidad, la RT-PCR, se pudo observar niveles bajos de ARNm de *LGI1* en corazón, hígado y páncreas (Chernova *et al.*, 1998). Los niveles encontrados en el tejido aislado de nervio periférico fueron intermedios entre los observados en cerebro y el resto de tejidos. Gu y colaboradores analizaron un número mayor de tejidos por la misma técnica corroborando los resultados de Chernova. El nivel de expresión en el resto de los tejidos (placenta, pulmón y riñón) fue mínima pero patente (Gu, Wevers *et al.*, 2002).

En cuanto a la regionalización en el cerebro, los experimentos de inmunohistoquímica realizados por Gu y colaboradores en cerebro humano indicaron que *LGI1* se expresa en todas las capas de la corteza frontal y temporal. Además la mayoría de las neuronas marcadas resultaron ser de tipo piramidal (Gu, Wevers *et al.*, 2002).

La inmunohistoquímica realizada por nuestro grupo en cerebro de ratón adulto (Figura 4) reveló que *LGI1* se expresa por todo el cerebro, principalmente en células neuronales y con poca expresión en células gliales. También se observó un marcaje puntuado característico de terminales sinápticos y para confirmarlo se llevaron a cabo experimentos de inmunocitoquímica en cultivos primarios de neuronas corticales embrionarias. *LGI1* resultó estar presente en los terminales, cuerpos celulares y en los conos de crecimiento. Todo ello indicaba que *LGI1* podría ser una proteína de vesícula (Morante-Redolat *et al.*, 2002).

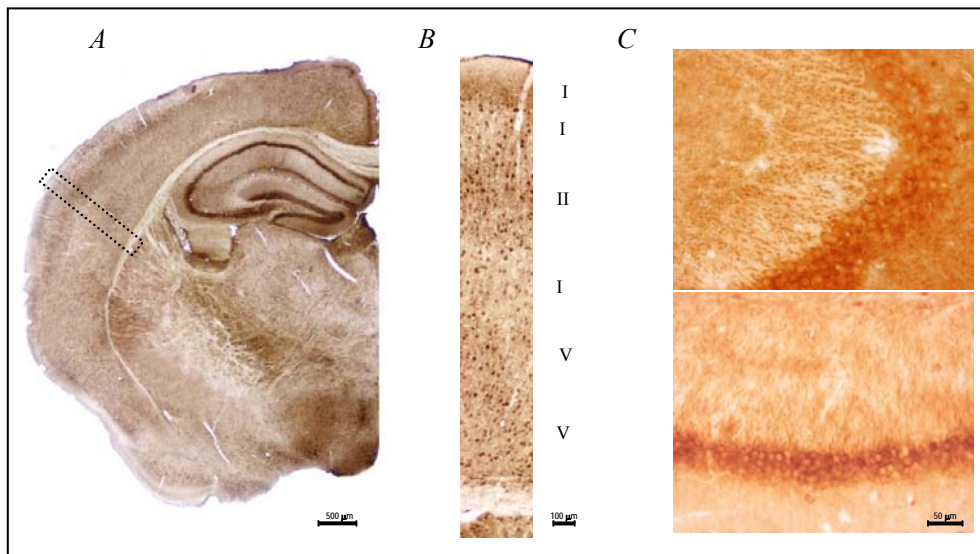


Figura 4: Expresión de Lgi1 en cerebro de ratón. **A:** Visión general en corte coronal donde se aprecia la expresión de Lgi1 distribuida por todas las regiones. **B:** Expresión de Lgi1 en todas las capas del córtex (I-VI). **C:** Detalle de la expresión de Lgi1 en el hipocampo. Destaca el escaso marcaje en las interneuronas presentes en el estrato molecular del hipocampo. Todas las imágenes son anti-Lgi1. Publicado en (Morante-Redolat *et al.*, 2002).

Por otra parte y al mismo tiempo, el grupo de Ottman, para determinar si *LGI1* se expresa predominantemente en neuronas o en células gliales, llevaron a cabo una hibridación *in situ* de ARN en cerebro de ratón adulto. El patrón de *LGI1* resultó ser predominantemente neuronal. Es de resaltar la alta expresión en las células granulares del giro dentado, en las células de cuerpo grande del hilus y en las células piramidales de la región CA3 en cuanto al hipocampo se refiere. También se observó expresión en la amígdala, en la corteza piriforme y en la corteza lateral dorsal, incluyendo la corteza auditiva (Kalachikov *et al.*, 2002). Estos resultados han sido corroborados por Senechal y colaboradores (Senechal *et al.*, 2005).

Recientemente, experimentos realizados en cerebro de rata adulta por Schulte y colaboradores indican una localización de *LGI1* en el compartimento presináptico. Han podido observar marcaje de *LGI1* en células granulares del giro dentado, en el sistema fibrilar musgoso y en menor grado, en las células piramidales de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo (Schulte *et al.*, 2006).

Los únicos resultados publicados hasta la fecha en el pez cebra mediante hibridación *in situ* revelan una expresión del gen homólogo de *LGI1* en tejido neuronal de muestras embrionarias. En secciones del cerebro de pez cebra adulto se ha podido observar que *LGI1* se expresa en la capa externa de la zona gris periventricular del tectum óptico, un área rica en neuronas tectales. En dicho trabajo no pudo detectar expresión de *LGI1* en células gliales, pero sí se detectó expresión en áreas nucleares de células ganglionares (Gu, Brodtkorb *et al.*, 2005).

1.3.4. Estructura de *LGI1*.

Mediante estudios a nivel genómico y bioinformático, el grupo de Cowell (Chernova *et al.*, 1998; Somerville *et al.*, 2000) describió que *LGI1* se encuentra situado a nivel genómico en una región de aproximadamente 25kb, estando codificado por 8 exones de tamaños entre 72 pb y 1197 pb. El ARNm contiene una pauta abierta de lectura de 1674 pb que comienza con un codón de inicio ATG en posición 225 desde el comienzo del exón 1 y codifica para una proteína de 557 aminoácidos.

En la Tabla 5 se muestra un resumen de la estructura de los exones de *LGI1* tal como los describieron Somerville y cols (Somerville *et al.*, 2000) y Krex y colaboradores (Krex *et al.*, 2002).

Tabla 5: Estructura genómica de *LGI1*

			exón 1 (5' UTR)
			GATCCCTC...
exón 1 (5' UTR)	exón 1(codificante)		intrón 1
...TCGACTGC	ATGGAA...	...CTCATT	gtaaggcccg...
intrón 1	exón 2		intrón 2
...tttctttcag	ATCCTT...	...GCTCTT	gtgagaaata...
intrón 2	exón 3		intrón 3
...ttctgggcag	GTTATT...	...GTATTT	gtaagtaaaa...
intrón 3	exón 4		intrón 4
...cttattgcag	ATTCAT...	...TCACTT	gtaaagtatg...
intrón 4	exón 5		intrón 5
...ttttttccag	GAGCCT...	...AAATGT	gtaagaggac...

Tabla 5 (continuación): Estructura genómica de *LGI1*

intrón 5		exón 6		intrón 6
...tgtctttcag		GTGGAC...	...TTACAG	gtaatgtact...
intrón 6		exón 7		intrón 7
...atttttgag		AATTTG...	...TTACAG	gtatgaaaag...
intrón 7		exón 8 (codificante)		exón 8 (3'UTR)
...cttttccag		GCACAT...	...GCATGA	GACACCAA...
exón 8 (3'UTR)				
...CTTTCATA				

En color azul: secuencia no codificante, en color negro: secuencia codificante, en mayúsculas: secuencia exónica, en minúsculas: secuencia intrónica, UTR (*UnTranslated Region*).

En la región 3' UTR del mensajero se identificó un sitio de poliadenilación. Sin embargo, en la región anterior al inicio de la transcripción no se hallaron secuencias que indicaran la presencia de un promotor (cajas TATAA o CAAT). Aún así se delimitó una región mínima de 597pb capaz de dirigir la expresión del gen de la luciferasa en un estudio *in vitro* (Somerville *et al.*, 2000).

Mediante herramientas informáticas de predicción Chernova y colaboradores (Chernova *et al.*, 1998) establecieron que la proteína *LGI1* posee una región hidrofóbica al comienzo de su secuencia (amino ácidos 1-34) que actuaría como péptido señal, siendo eliminado por corte proteolítico para dar lugar a la proteína madura de 60 kDa que se dirigiría hacia la membrana. Por otra parte, predijeron la existencia de otra región hidrofóbica (aminoácidos 288 a 309) codificada en el exón 8 que constituiría un dominio transmembrana (Figura 5). Este dominio, formado por una única hélice, atravesaría la membrana una vez, dejando la región N terminal en el exterior celular (Chernova *et al.*, 1998).

En la región comprendida entre el péptido señal y el dominio transmembrana, identificaron un dominio constituido por Repeticiones Ricas en Leucina (LRRs) flanqueadas por dos dominios ricos en Cisteína (Figura 5). Las LRRs encontradas en *LGI1*, tres repeticiones y media según Chernova (Chernova *et al.*, 1998), cuatro y media según Somerville (Somerville *et al.*, 2000), presentan una fenilalanina conservada en posición 20 dentro de la repetición, lo que las sitúa en la familia F-20 de proteínas ricas en Leucina. La combinación de repeticiones ricas en leucina y dominios flanqueantes ricos en cisteína, por otra parte, es una característica típica de proteínas extracelulares o dominios en la porción extracelular de proteínas de membrana (Buchanan *et al.*, 1996). Además, el análisis de *LGI1* que hacen Krex y colaboradores revela otro patrón conservado y es que cada LRR es interrumpido en el quinto amino ácido por un intrón de tamaño variable (Krex *et al.*, 2002). Este grupo también

identifico el marcador WI-16274 como un marcador intragénico localizado 1.2 kb tras del exón 4.

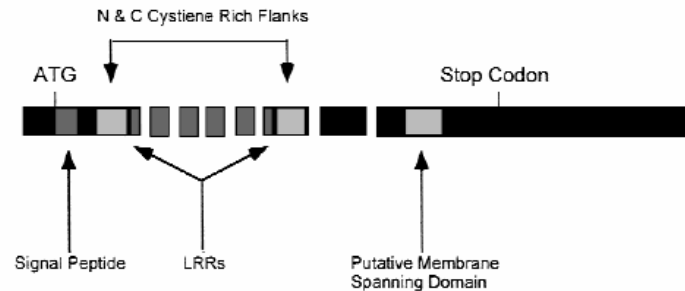


Figura 5: Representación esquemática de la organización exón-intrón de *LGI1* y los motivos estructurales descritos por Chernova y cols. y Somerville y cols. Publicado en (Somerville *et al.*, 2000).

En la región C-terminal, teóricamente intracelular, no lograron encontrar homología con ningún dominio conocido. Fue en el trabajo de Morante-Redolat y colaboradores de 2002 dónde se describieron dos copias de una secuencia repetida de 136 y 130 amino ácidos en posición 226-361 y 420-549 respectivamente (Figura 6). La primera de las repeticiones incluye la región previamente identificada por Chernova y colaboradores como posible dominio transmembrana. De hecho, cuando se reanalizó con nuevos programas informáticos el dominio transmembrana previsto por Chrenova, en ningún momento se alcanzó el umbral de significación estadística de los programas utilizados (Morante-Redolat *et al.*, 2002).



Figura 6: Estructura de dominios de *LGI1*. Cuadro negro: péptido señal; círculos grises: dominios ricos en cisteína N y C terminales; cuadrados grises: dominios ricos en leucinas; óvalos blancos: repeticiones 1 y 2 internas. Publicado en (Morante-Redolat *et al.*, 2002).

Un análisis más profundo de estas repeticiones (denominadas repeticiones epitempina o EPTP por Staub y colaboradores y repeticiones EAR por Scheel y colaboradores) por parte de Staub y colaboradores donde se utilizaron técnicas de análisis de secuencias avanzada, descubrió una repetición interna más corta de unos 50 residuos (Figura 7). Localizaron 7 repeticiones en la región C-terminal, las cuales pueden formar en conjunto una estructura β -*propeller* tal como sugieren Staub y colaboradores (Staub *et al.*, 2002). Simultáneamente, Scheel y colaboradores llegaron a conclusiones similares (Scheel *et al.*, 2002).



Figura 7: Arquitectura de dominios de LGI1 según Staub y cols. Los dominios son: regiones ricas en cisteína N-terminal (verde); regiones ricas en cisteína (rosa); regiones ricas en leucina C-terminal (gris); repeticiones EPTP (rojo). Publicado en (Staub *et al.*, 2002).

En la secuencia de LGI1 Chernova y colaboradores encontraron dos sitios potenciales de glicosilación (Asn192 y Asn277) en el dominio N-terminal así como una serina (Ser313) y una tirosina (Tyr384) potencialmente fosforilables por acción de la proteína quinasa dependiente de AMPc o tirosín kinasas. Además, encontraron varias dianas de fosforilación para la proteína quinasa C (PKC) y la caseína quinasa II (Chernova *et al.*, 1998).

1.3.5. Análisis de homología.

En el trabajo original de Chernova se utilizó la secuencia de las repeticiones ricas en Leucina de LGI1 para realizar un estudio de homología con otros genes conocidos. Este estudio fue ampliado posteriormente por Krex y colaboradores. Encontraron que las LRRs de LGI1 presentan cierta homología con las que se

encuentran en proteínas como slit, tall, osteomodulina o bliglicano (38-41% de identidad, 58-67% de similitud) (Chernova *et al.*, 1998).

En el trabajo de Krex extendieron la región de homología incluyendo, además de las LRRs, los dominios flanqueantes ricos en Cisteína N-term y C-term. De este modo acotaron la homología a proteínas pertenecientes a dos familias: los receptores de neurotrofinas TRK (en concreto TRKA y TRKC) y los homólogos del gen de *Drosophila* slit (h-SLIT2 y h-SLIT3). Como resultado de las estimaciones filogenéticas realizadas, estas homologías se fortalecen y se observa que LGI1 se encuentra filogenéticamente más cercano a la familia SLIT que a los genes TRK, lo cual aporta evidencias de su posible relación funcional (Krex *et al.*, 2002). Tanto SLIT como TRK son familias de genes con funciones esenciales en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso. Estos estudios sugieren que LGI1 podría estar implicado también en estos procesos.

En la búsqueda de homologías al dominio EPTP descrito por Staub y colaboradores se han encontrado dos proteínas, VLGR1 y TNEP1 (Scheel *et al.*, 2002).

TNEP1 se localiza en el cromosoma 21q22.3, cerca de la región crítica del síndrome Down mientras que VLGR1 es un gen localizado en una región cromosomal (5q14-15) asociada con convulsiones febriles familiares (Nakayama *et al.*, 2003). Este gen ha sido también descrito como homólogo al gen murino Mass1 (el cual realmente es parte de la secuencia completa de VLGR1), mutado en un modelo natural de crisis audiogénicas (Skradski *et al.*, 2001). Nakayama describió una familia con crisis febriles y mutaciones en el gen Mass1 (Nakayama *et al.*, 2002), pero posteriormente otro grupo no ha encontrado mutaciones en este gen en una familia con convulsiones febriles ligada al cromosoma 5 (Deprez *et al.*, 2006). Por otro lado, la repetición EPTP es el único motivo que une los tres genes *TNEP1*, *VLGR1* y *LGI1*.

1.3.6. Genes parálogos de LGI1.

Cuando se describe por primera vez un miembro de una familia de genes relacionado a una enfermedad humana, el resto de los genes pertenecientes a la familia son considerados como candidatos para desórdenes parecidos. Gu y colaboradores identificaron y caracterizaron tres genes parálogos de LGI en base a las LRR: LGI2, LGI3 y LGI4, cada uno localizado en un cromosoma distinto (4p15.2, 8p21.3 y 19q13.11 respectivamente) (Gu, Wevers *et al.*, 2002). Todos ellos se expresan en el cerebro además de otros tejidos y codifican para proteínas de 545, 549 y 538 residuos

respectivamente. Así mismo, estos autores verificaron la similitud en la posición de la unión intrón-exón excepto para LGI4 que incluye un intrón extra en la parte 3'-terminal.

Las repeticiones EPTP descritas en LGI1 también se han detectado en el resto de los genes LGI, reforzando la agrupación de estos cuatro genes en una familia (Scheel *et al.*, 2002; Staub *et al.*, 2002).

Reforzada la hipótesis de que los cuatro genes LGI pertenecen a una nueva subfamilia dentro de la superfamilia de las proteínas LRR y puesto que genes relacionados funcional o estructuralmente a LGI1 son candidatos para distintas epilepsias, se han buscado mutaciones en estos genes en familias ADLTE, si bien no se ha encontrado ninguna mutación hasta este momento (Berkovic *et al.*, 2004; Ayerdi-Izquierdo *et al.*, 2006). Se han detectado polimorfismos en los tres parálogos de LGI1, pero todos ellos son polimorfismos que no segregan con la enfermedad y que también se encuentran en la población sana, descartando la posibilidad de que estos genes confieran un incremento de susceptibilidad respecto a ADLTE (Ayerdi-Izquierdo *et al.*, 2006). Es interesante sin embargo, resaltar la asociación genética entre un polimorfismo exónico de LGI4 y la epilepsia infantil con ausencias descrita por el grupo de Gu (Gu *et al.*, 2004).

1.3.7. Genes ortólogos de LGI1.

Somerville y colaboradores en el año 2000 clonaron el gen *Lgi1* de ratón ([NM_020278](#)) el cual demostró tener una homología del 91% a nivel de nucleótido y del 97% a nivel de amino ácido con el gen humano. Sin embargo, el ARNm resultó ser más largo debido a 2kb extras en la región 3' no traducida del ratón. Las posiciones exón/intrón se conservan en ambas especies (Somerville *et al.*, 2000).

El gen homólogo en rata (CAD31785) también tiene una homología del 91% a nivel de nucleótido y aunque no se ha caracterizado tan exhaustivamente como el de ratón, también ha sido utilizado en la bibliografía en técnicas como la inmunohistoquímica para inferir información sobre LGI1 humano (Schulte *et al.*, 2006).

Al analizar las bases de datos de secuencias de diferentes especies, Gu y colaboradores demostraron que no existen ortólogos de la familia de LGI1 en los genomas de invertebrados. Sin embargo pudieron describir cinco genes LGI en el pez cebra (*Danio rerio*) (*lgi1a*, *lgi1b*, *lgi2a*, *lgi2b* y *lgi3*) (Gu, Gibert *et al.*, 2005).

1.3.8. Mutaciones y polimorfismos en LGI1.

Además de las dos mutaciones que se describen en este trabajo (capítulo I), hasta la fecha se han encontrado un total de 20 mutaciones en la secuencia de LGI1 en familias con Epilepsia Lateral Temporal Autosómica Dominante. Las mutaciones, encontradas en todos los casos en heterocigosis, provocan la aparición de proteínas truncadas de diferente tamaño o bien cambios puntuales de un aminoácido por otro. Las mutaciones se distribuyen a lo largo de toda la secuencia de LGI1, no encontrándose éstos agrupados entorno a ningún dominio concreto. Tampoco se han encontrado diferencias evidentes en el fenotipo asociadas al impacto de la mutación sobre la proteína, por ejemplo proteínas truncadas frente a cambios de un único aminoácido.

En la Tabla 6 se resumen las mutaciones descritas esquematizándose la localización de las mutaciones que provocan proteínas truncadas (Kalachikov *et al.*, 2002; Morante-Redolat *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2003; Hedera *et al.*, 2004), así como las que provocan sustituciones de aminoácidos (Gu, Brodtkorb *et al.*, 2002; Kalachikov *et al.*, 2002; Morante-Redolat *et al.*, 2002; Wallace *et al.*, 2002; Fertig *et al.*, 2003; Michelucci *et al.*, 2003; Berkovic *et al.*, 2004; Hedera *et al.*, 2004; Ottman *et al.*, 2004; Pisano *et al.*, 2005).

Tabla 6.:Mutaciones en LGI1 en familias con ADLTE. Representación del cambio en el ADN, en el exón-intrón que se produce y el efecto final sobre la proteína.		
Mutación	Exón	Efecto
c.124 T→C	1	Mutación puntual p.C42R (Michelucci <i>et al.</i> , 2004)
c.124 T→G	1	Mutación puntual p.C42G (Ottman <i>et al.</i> , 2004)
c.136 T→C	1	Mutación puntual p.C46R (Gu <i>et al.</i> , 2002)
c.329 delC	3	Cambio en la pauta de lectura, proteína truncada (Hedera <i>et al.</i> , 2004)
c.329 C→A	3	Mutación puntual p.A110D (Ottman <i>et al.</i> , 2004)
c.360-3C→A	3-4	Retención intrón, proteína truncada (Kalachikov <i>et al.</i> , 2002)
c.435 C→G	5	Mutación puntual p.S145R (Hedera <i>et al.</i> , 2004)
c.461 T→C	5	Mutación puntual p.L154P (Pisano <i>et al.</i> , 2005)
c.598 T→C	6	Mutación puntual p.C200R (Michelucci <i>et al.</i> , 2003)
c.611delC	6	Cambio en la pauta de lectura, proteína truncada (Kalachikov <i>et al.</i> , 2002)
c.758 delC	7	Cambio en la pauta de lectura, proteína truncada (Morante-Redolat <i>et al.</i> 2002)
c.839-2 A→C	7-8	Retención intrón, proteína truncada (Kobayashi <i>et al.</i> , 2003)
c.893 T→C	8	Mutación puntual p.I298T (Ottman <i>et al.</i> , 2004)
c.953 T→G	8	Mutación puntual p.F318C (Fertig <i>et al.</i> , 2003)
c.1050-1051 delCA	8	Cambio en la pauta de lectura, proteína truncada (Kalachikov <i>et al.</i> , 2002)
c.1148 A→C	8	Mutación puntual p.E383A (Kalachikov <i>et al.</i> , 2002)
c.1295 T→A	8	Mutación puntual p.V432R (Michelucci <i>et al.</i> , 2003)
c.1418 C→T	8	Mutación puntual p.S473L (Wallace <i>et al.</i> , 2002)
c.1420 C→T	8	Codón de parada prematuro RStop (Morante-Redolat <i>et al.</i> , 2002)
c.1639 insA	8	Cambio en la pauta de lectura, proteína truncada (Kalachikov <i>et al.</i> , 2002)

Además de describir mutaciones en *LGI1* en familias afectadas de ADLTE, Kalachikov y colaboradores rastrearon los exones 3, 4, 6, 8 (en los que habían hallado las mutaciones en familias por ellos analizadas) y las respectivas regiones flanqueantes intrónicas en 123 individuos controles, encontrando varios polimorfismos (cambios de amino ácidos no codificantes) (Kalachikov *et al.*, 2002). Así mismo se han descrito otros polimorfismos en la literatura, como son los dos cambios intrónicos, c.287+19A>G y c.674-18T>C (Nakayama *et al.*, 2003) y un cambio sin alteración de la secuencia aminoacídica en el exón 7 de *LGI1* (c.717A>C) (Berkovic *et al.*, 2004). Habiendo previamente encontrado una mutación en el gen *MASS1/VLGR1* que afecta a su dominio EPTP en una familia con crisis febriles, Nakayama y colaboradores quisieron comprobar si otro gen con dominios EPTP en su estructura, *LGI1*, confiere susceptibilidad a crisis febriles. Estos autores, no hallaron evidencia de que exista una asociación significativa entre los polimorfismos en *LGI1* y crisis febriles (Nakayama *et al.*, 2003).

Por otra parte, el grupo de Krex, en la búsqueda de mutaciones en *LGI1* asociadas a gliomas, analizó 531pb de la región promotora y 111pb del exón 1. Dentro de esta secuencia identificaron dos SNP, ambos en la región promotora. Una de ellas se encontró tanto en homocigosis como en heterocigosis en 20 individuos sanos y en una línea celular de glioblastoma (H4), mientras que la segunda variación polimórfica sólo se describió en heterocigosis en individuos sanos y en ninguna de las líneas celulares estudiadas. Los polimorfismos descritos son c.-500 G>A y c.-197 G>C respectivamente (Krex *et al.*, 2002). No era la primera vez que se estudiaba la región promotora de *LGI1*. Somerville y colaboradores, sabiendo que la transcripción de algunos supresores de tumores puede ser silenciada por la metilación del promotor, estudiaron dicha región, concluyendo que probablemente éste no sea el mecanismo responsable de la pérdida de expresión del gen *LGI1* en tumores (Somerville *et al.*, 2000).

A los polimorfismos puntuales mencionados previamente podemos añadir la región de 64pb en el intrón 4 de *LGI1* con carácter de repetición microsatélite que identificaron Krex y colaboradores (Krex *et al.*, 2002).

Material y Métodos

2.1. Material biológico.

2.1.1. Muestras humanas.

El reclutamiento de los individuos se llevó a cabo por el Servicio de Neurología del Hospital Donostia de San Sebastián, y otros laboratorios de España, Alemania e Italia dentro del Consorcio Europeo. Se reclutaron también 70 individuos aparentemente sanos para el grupo control. Los datos clínicos de todos los individuos se recogieron por los médicos que los estudiaron mediante una entrevista personal. A todos los individuos se les recogió un documento de consentimiento informado, firmado tanto por el individuo que se incluía en el estudio como por el médico testigo.

Para el almacenamiento de todos los datos clínicos y biológicos se diseñó una extensa y completa base de datos, para posteriormente poder hacer las consultas necesarias y poder traspasar la información al programa de diseño de árboles familiares *Cyrillic 2.1*.

Las características clínicas de las familias se resumen en las tablas 7 y 8.

Tabla 7: Características clínicas de las familias españolas.

Datos clínicos	ADLTE-01	ADLTE-02	ADLTE-03	ADLTE-04	ADLTE-05	ADLTE-06	ADLTE-07	ADLTE-08
nº pacientes (v/f)	13/6	5/0	3/0	4/2	1/0	4/0	3/1	4/0
Edad de inicio	11-40	18-62	15-23	7-37	n/d	12	n/d	8-34
Tipo de crisis (nº)					n/d		n/d	
Parcial	1	3	1	5		2		3
TCGS	9	3	2	5		2		1
TCOD	1	2	1	1				
Síntomas (nº)					n/d		n/d	
Auditivos	4	1	2	3		2		4
Visuales	5	1						
Afásicos								
Otros	2			2				
EEG interictal (nº/d)					n/d		n/d	
Normal	5/7	3/5	3/3	2/3		1/1		4/4
Anorm. L. Temp.	2/7	2/5		1/3				

v: vivos, f: fallecidos, TCGS: Tónico-clónica generalizada secundariamente, TCOD: tónico-clónica de origen desconocido, EEG: Electroencefalograma, nº/d: número/EEG disponibles, Anorm. L. Temp: Anormalidades en el lóbulo temporal, n/d: datos no disponibles.

Tabla 8: Características clínicas de las familias alemana e italianas.

Datos clínicos	G-1	I-1	I-2	I-3	I-4
n° pacientes (v/f)	6/3	3/3	3/3	3/1	3/0
Edad de inicio	11-50	8-12	18-20	8-30	22-46
Tipo de crisis (n°)					
Parcial			2	3	3
TCGS	8	3	2	3	3
TCOD	1		4	1	
Síntomas (n°)					
Auditivos	8	3	2	3	3
Visuales					2 ^a
Afásicos					1 ^a
Otros					2 ^a
EEG interictal (n°/d)					
Normal	2/6	1/3	1/3	0/2	2/3
Anorm. L. Temp.	4/6	2/3	2/3	2/2	1/3

v: vivos, f: fallecidos, TCGS: Tónico-clónica generalizada secundariamente, TCOD: tónico-clónica de origen desconocido, EEG: Electroencefalograma, n°/d: número/EEG disponibles, Anorm. L. Temp: Anormalidades en el lóbulo temporal.

^a Síntomas secundarios del aura.

2.1.2. Cepas bacterianas.

Escherichia coli. : subespecie DH5 α

2.1.3. Animales.

2.1.3.1. Ratones.

- Cepa: Se emplearon ratones B6D2F1
- Condiciones estabulación: Todos los ratones fueron mantenidos bajo ciclos constantes de luz/oscuridad de 12 horas, con la temperatura (21 \pm -1°C) y humedad (35-50%) controladas y alimentados *ad libitum* con pienso completo (Panlab). Los animales destinados a experimentos de comportamiento e inducción de crisis, se mantuvieron separados en jaulas individuales.

2.1.3.2. Peces.

- Cepa: Se emplearon peces de la especie *Danio rerio* AB.

- Condiciones acuarios: Los peces se alimentaron con *Artemia* viva. Se mantuvieron a 28,5°C con un ciclo de 14 h luz/10h oscuridad.

2.1.3.3. Ranas.

- Cepa: *Xenopus laevis*
- Condiciones: Las ranas se mantuvieron a 16-20°C con un ciclo de 12h luz/oscuridad.

2.2. Vectores de expresión empleados.

- **pDONOR** (Gateway, Lifetechnologies), vector que contiene los sitios de recombinación *attP*, para clonar por recombinación insertos de ADN flanqueados por sitios *attB* y generar un “clon o vector de entrada” Resistencia a Ampicilina.
- **pDEST 17** (Gateway, Lifetechnologies), es un vector de expresión en procariotas, que contiene los sitios *attL* y *attR* para clonar por recombinación a partir de un “clon o vector de entrada o pENTRY” y generar el “clon o vector de expresión”. El gen queda bajo el promotor del bacteriófago T7, por ello se debe transformar en una cepa de expresión que contenga el gen de la ARN polimerasa del fago T7. El marcador de selección en bacterias es la Kanamicina.
- **pEGFP.N1** (Clontech), este vector de expresión en eucariotas fusiona la proteína fluorescente verde (GFP) en el extremo C-terminal de la proteína. Resistencia a Kanamicina.
- **pSRCIII** (cedido por el Dr. Villarroel), es un vector diseñado para la expresión de proteínas en ovocitos de *Xenopus*. El ADNc clonado en este vector queda flanqueado por la secuencia no codificante 5' del gen globina y por la secuencia 3' polyA de SV40. Resistencia a Ampicilina.
- **pTSC21K-Thy1.2** (cedido por el Dr. Herman Van der Putten, Suiza), este vector está preparado para dirigir, bajo la expresión de un promotor Thy específico del SNC, un transgén en mamíferos. Resistencia a Ampicilina.

- **pCMV-SPORT6.1**, (Invitrogen), vector diseñado para la construcción de genotecas de expresión de vertebrados. Consta de dos sitios promotores, SP6 y T7, empleados para la transcripción *in vitro*. Resistencia a Ampicilina.

2.3. Cebadores empleados.

En las siguientes tablas se muestran los oligonucleótidos empleados y las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la tabla 12 (pg 62) se muestran los oligonucleótidos empleados en el rastreo de mutaciones en el gen *LGI1* y en la tabla 9 se incluyen los cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de la región 5' promotora de *LGI1*, estrategia que se esquematiza en la figura 8. Los marcadores microsatélites utilizados en el estudio genético de las familias ADLTE se agrupan en la tabla 10. Finalmente, en la tabla 11 se muestran los cebadores utilizados para clonar *LGI1* en los distintos plásmidos, en el caso de que la clonación se llevase a cabo por PCR, así como los cebadores con los que se ha confirmado la clonación o identificado las colonias bacterianas positivas.

Tabla 9: Cebadores y condiciones de PCR para la secuenciación de la región UTR5' de *LGI1*.

nº	Cebador	Pb	Tm
1	UTR5-F1 CTAAACTATCCCACCCCA	411	60TD50 ^a
	UTR5-R1 GGGACCCCTCTCTGTGTATAA		
2	UTR5-F2 GGTGCTACTGCCAAAGAA	427	60TD55 ^b
	UTR5-R2 GCATAGGATGTCTCGGCAAT		
3	UTR5-F3 GGCTCAGCAAGAAACATC	835	60°CL ^c
	heLGI1-x1R TCTCTCTCCATGCCCTTCTAC		

nº: número de par de cebador, **pb**: tamaño del amplicón en pares de bases, **Tm**: Temperatura del ciclo de hibridación en la PCR.

^a 60TD50 hace referencia a un protocolo de tipo *touchdown* en el que tras 4 ciclos a 60°C, la temperatura de hibridación desciende 0,5°C/ciclo hasta alcanzar 50°C. El resto de ciclos hasta completar 35 se realizan a 50°C.

^b 60TD55 hace referencia a un protocolo de tipo *touchdown* en el que tras 4 ciclos a 60°C, la temperatura de hibridación desciende 0,5°C/ciclo hasta alcanzar 55°C. El resto de ciclos hasta completar 35 se realizan a 55°C.

^c 60°CL hace referencia a un protocolo en el que el tiempo de elongación en el total de los 40 ciclos se extiende hasta 1'30".

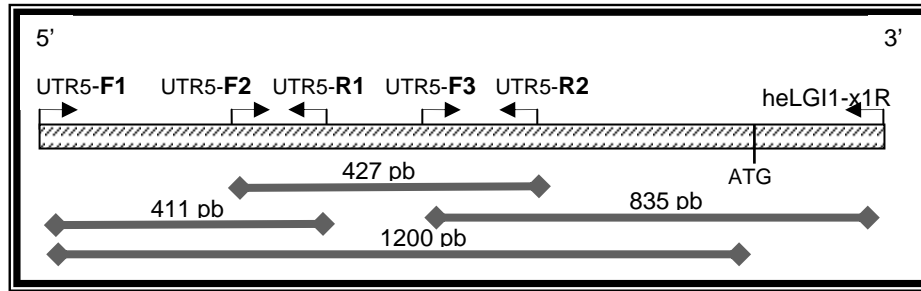


Figura 8: esquema de la estrategia para la amplificación y posterior secuenciación de la región UTR5' de *LGI1*. Las flechas indican los cebadores de la región UTR5' utilizados. En líneas horizontales están representadas los tres fragmentos amplificados con sus tamaños respectivos en pb, así como los 1200pb totales secuenciados desde el codón de inicio ATG. Para la secuenciación se utilizaron los mismos cebadores.

Tabla 10: Marcadores microsatélites empleados en el estudio genético de las familias ADLTE.

Marcador	Posición	Cebador Directo	Cebador Reverso	Fl	pb	Tm
D10S185	102.147.831	TCCTATGCTTTCA TTTGCCA	CAAGACACACGA TGTGCCAG	F	143-159	60TD50 ^a
D10S200	102.215.563	TCTGGTTATTTGT CTGGGGA	GCATGGTGTCT GTGCTGTAG	H	291-303	60TD50
D10S1680	102.500.167	AGCCTGAGCAAC ATATCGAA	TCCCGAAGCAG AGAGTACCT	T	201-219	60TD50
D10S677	102.855.243	AAGATACACAGG AAGAAAGAAAGG	AGGGTCAAAAAG GAGATTGCT	F	197-225	60TD50
D10S520	103.315.717	GCACTCCAGCCTA TGCAAC	GTCTTGTGAG AAACTGGATG	H	145-205	45°C
D10S571	104.256.276	CAGTCCTTGCTTT GTCAGAA	ATGTACACTGTG TCTGTAATCCCT	T	187-213	60TD50
D10S1736	105.321.380	GGTTCTGACCCTG AGATTG	AGACTTGTGAG TGTGCCG	H	128-146	60TD50
D10S1758	106.173.939	ATAATGCACACGC TGCC	AATTCCCGTGGA GGTTT	F	181-197	60°C ^b
D10S577	106.341.900	TTGCACACCAGCC TAAG	GCCCAAGAGTT GGAGAC	H	199-213	60TD50

Fl: tipo de fluoróforo, **F:** Fam, **H:** Hex, **T:** Tet, **pb:** tamaño del amplicón en pares de bases, **Tm:** Temperatura del ciclo de hibridación en la PCR.

^a 60TD50 hace referencia a un protocolo de tipo *touchdown* en el que tras 4 ciclos a 60°C, la temperatura de hibridación desciende 0,5°C/ciclo hasta alcanzar 50°C. El resto de ciclos hasta completar 35 se realizan a 50°C.

^b Indica que a la reacción de PCR se le añadió DMSO en una concentración final del 5% junto con la Taq express.

Tabla 11: Cebadores y su utilización.

nº	cebador	secuencia	Utilización
1	attB1-ATG-LGI1-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGC AGGCT ATGGAATCAGAAAGAAGC	Clonación de LGI1 en el sistema Gateway
2	attB2-TGA-LGI1-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTCTCA TGCGCTTAAAGTCAAC	
3	<i>Xho</i> I-hLGI1 S/D- F	ATTTAACTCGAGGAAGGAGATAGA ACC ATG GAATCAGAAAGAAGC	Clonación de LGI1 en pEGFP-N1
4	<i>Eco</i> RI-hLGI1nostop-R	GGAAGGGAATTCGTGCGCTTAAAGT CAAGTAT	
5	LGI1Transg-F	GATATACTCGAGGGATATTTCTCG ACTGC ATGGAATCAGAAAGA	Clonación de LGI1 en pTSC21K
6	LGI1wtTransg-R	GTCTAGACTCGAGGGATCATGCGC TTAAGTCAAC	
7	LGI1mut01transg-R	TCTAGACTCGAGGGACTACAGTGG ATGTGCTG	
8	LGI1Xenop-F	GATATCGAATTCCGCATGGAATCA GAAAGAAGC	Clonación de LGI1 en pSRCIII
9	LGI1wtXenop-R	CTCAGAACTAGTGGATCATGCGCT TAAAGTCAAC	
10	pTSC21K-LGI1-F	CACAGAATCCAAGTCGGA	Selección de clones pTSC21K-LGI1 y genotipado de ratones transgénicos
11	heLGI1-x2R	AAACTCCCTTCTGAGATTTC	
12	GFP-F	CGACGTAAACGGCCACAAGTTCA	Genotipado de embriones GFP
13	GFP-R	GCCGTCGTCCTTGAAGAAGATGG	

nº: número de referencia del cebador a efectos de citación en el texto. Las secuencias en negrita corresponden a los attB1 en el cebador directo #1(-F) y attB2 en el reverso #2 (-R), mientras que en el resto de los cebadores corresponde a la diana de restricción incluida en el cebador. Subrayadas se encuentran las bases que constituyen el codón de inicio ATG y el codón de parada TGA. Sombreado la secuencia Kozak incluida en el cebador.

2.4. Extracción de ADN.

2.4.1. A partir de sangre periférica humana.

Para la extracción de ADN a partir de sangre periférica se comienza por centrifuga la muestra de sangre completa durante 20' a 2000g sin freno a T^a ambiente (21°C). Se desecha el suero por aspiración y se recoge la interfase que contiene las células blancas, a las que se les añade 2 volúmenes de solución de lisis (0,144M NH₄Cl; 1mM NaHCO₃). Se agita violentamente el tubo y se deja reposar 5' para volver a agitar otro minuto. Se centrifuga durante 40', 2000g sin freno después de lo cual se elimina el sobrenadante con cuidado de no arrastra el sedimento. Se le añaden 20ml de solución

de lisis, se centrifuga durante 30' a 1500g con freno y se elimina el sobrenadante. Se repiten estos tres últimos pasos dos veces más hasta que el pellet quede blanco o rosado y finalmente se resuspende el pellet en el líquido residual utilizando el *vortex*. Se añaden 3,5ml de lisis de leucocitos (10mM Tris-HCl pH8,2; 0,4M NaCl; 2mM Na₂EDTA pH8) con 100µl de proteinasa K (8mg/ml) y se vuelve a agitar en vortex. Llegado a este punto, se puede incubar toda la noche a 37°C o bien 2h a 50°C. Al finalizar esta incubación se le añaden 50µl de proteinasa K y se incuba 1-2h a 50°C.

Se deja enfriar la muestra a temperatura ambiente y se le añaden 1,27ml de acetato amónico 7,5M (4°C) para la precipitación de las proteínas. Se agita bien en un *vortex* y se enfría a 4°C durante un mínimo de 10', tras de lo cual se centrifuga a 3220g a 4°C durante 60', sin freno. Se recoge el sobrenadante resultante y se procede a precipitar el ADN añadiendo 2,5volúmenes de etanol absoluto (-20°C) y volteando el tubo. El ADN precipitado se “pesca” con una pipeta Pasteur de punta doblada (fabricada a la llama a tal efecto), haciendo que se enrolle en el vidrio y después se lava con etanol. Las pipetas con el ADN se dejan secar al aire (15') mientras se preparan unos tubos con TE (Tris HCl 10mM, pH8; EDTA 1mM pH8) (unos 400µl) en los que se deja la punta de la pipeta con el ADN. Por último, las muestras se dejan en agitación toda la noche, con lo que estarán preparadas para la cuantificación en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260nm.

2.4.2. A partir de cola de ratón.

La biopsia a partir de cola de ratón se incuba con 500µl de tampón de lisis (100mM TrisHCl pH8, 5mM EDTA, 0,2% SDS, 200mM NaCl) y proteinasa K a una concentración final de 100µg/ml para dejarla incubar a 55°C de 4h hasta toda la noche. Se agita enérgicamente antes de centrifugarlo a máxima velocidad y durante 10 minutos en una centrífuga de mesa y el sobrenadante se vierte en tubos de 1,5ml añadiéndole un volumen de isopropanol, es decir, 500µl, para precipitar el ADN. A continuación se deja el tubo en una noria durante media hora, se centrifuga durante 5 minutos y se desecha el sobrenadante con cuidado de no eliminar el pellet de ADN. El ADN se lava dos veces con etanol al 70%, después de lo cual se deja secar no más de 5min y se resuspende en 200µl de tampón TE (10mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA). Por último, se incuba 15 min a 55°C, y se agita violentamente con la ayuda de una gradilla para facilitar la disolución del ADN. Se centrifuga durante un minuto y se guarda a 4°C.

2.5. Extracción de ARN.

Se extrajeron los cerebros de ratones adultos, se limpiaron en PBS frío y se dividieron en dos, un hemisferio se guardó a -80°C y el segundo se sumergió en 1ml de Tripure (Roche) para la homogenización con el politrón. En todo momento las muestras se mantuvieron en frío y en condiciones libre de RNAsas.

Se añadieron 240µl de cloroformo a cada muestra y tras agitar enérgicamente e incubar 10min a temperatura ambiente, se centrifugaron para recoger la fase superior. El ARN se precipitó con 300µl de isopropanol. Tras agitar fuertemente en *vórtex*, incubar 10 min a 4°C y centrifugar, se descartó el sobrenadante, se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en agua-DEPC (Dietil pirocarbonato 1:1000 en agua desionizada). Las muestras se guardaron a -80°C.

2.6. Extracción de proteínas para electroforesis bidimensional.

Se sacrificaron ratones B6D2F1 por luxación cervical para la extracción del cerebro. Éstos se lavaron en PBS 1X frío y se utilizó medio cerebro (corte sagital) de cada muestra para la extracción de proteínas, manteniendo durante todo el proceso las muestras en frío (4°C). Se añade 1ml de tampón de lisis (7M Urea, 4% Tritón X-100, 2M Thiourea, 20mM DTT añadido en el momento de uso) a cada medio cerebro y se homogeniza con un politrón el tejido. Para romper aún más el tejido se sonicar las muestras (10sg X5 a 8 microns de amplitud) en un sonicador y tras centrifugarla durante 45min a 16000g a 4°C se precipitan las proteínas del sobrenadante con acetona glacial (10min a -80°C). Se centrifuga la muestra (30min a 16000g) y se lava con acetona 80%. La acetona se elimina con nitrógeno gaseoso, evitando que la muestra llegue a secarse excesivamente, y se resuspende en 800µl de tampón de lisis.

Con el objetivo de obtener una muestra más limpia y libre de lípidos, utilizamos el Kit 2D Clean-Up (Amersham Bioscience) con 100µl de proteína, según las instrucciones del fabricante y resuspendiéndola a su vez en 100 µl de tampón de lisis.

Las proteínas se cuantificaron según el método Bradford (BioRad) utilizando albúmina (Sigma) para construir la curva patrón.

2.7. Búsqueda de mutaciones.

Para la búsqueda de mutaciones se amplificó mediante PCR el ADN genómico de los pacientes extraído a partir de sangre periférica utilizando cebadores específicos de la región intrónica flanqueante a cada uno de los 8 exones del gen. En todos los casos se utilizó la *Taq* polimerasa de la casa comercial Qiagen con la mezcla de reacción recomendada por el fabricante. Las condiciones de amplificación fueron: una etapa de desnaturalización inicial de 10min a 95°C seguido de 35 ciclos constituidos por una etapa de desnaturalización de 30sg a 95°C, una etapa de hibridación de 30sg a la temperatura adecuada para cada pareja de cebadores (tabla 12) y una etapa de extensión de 45sg a 72°C. La reacción se concluyó con una etapa de extensión final de 5min a 72°C. En algunos casos fue necesario añadir a la mezcla de reacción el aditivo Q suministrado con la polimerasa tal y como se indica en la tabla 12.

Los productos amplificados se purificaron con el kit *Concert nucleic acid purification system* de la casa comercial Invitrogen y se secuenciaron utilizando el sistema *BigDye v2.0 dye terminator kit* obteniendo las secuencias en un secuenciador modelo ABIPrism 3100 de Applied Biosystems.

La búsqueda de mutaciones se realizó comparando las secuencias resultantes de cada exón para cada uno de los afectados estudiados con la secuencia de *LGI1* obtenida de las bases de datos públicas.

Tabla 12: Cebadores y condiciones de PCR para el rastreo de mutaciones en el gen *LGI1*.

E	Cebador Directo	Cebador Reverso	pb	Tm
1	GGTGGACTCCTATGTGACCTG	TCTCTCTCCATGCCCTTCTAC	438	60°C
2	GCTAAACCGGATTAAACATAAGG	GGCTTATCCAAATATATGCC	219	48°C ^a
3	ACAATCTGTCTAGTTTCACC	TTGAGAGTACTTGTCTCTGAATC	171	48°C
4	CAGGACAAGTACTCTCAAGTTC	ACAGGTGATCAAAGTGCATTG	197	60TD50 ^b
5	TCCTACAGTTTACATCACC	AGGCTTCCTTGTTAATGA	172	50°C
6	CGTGGGTAGGGTCCCTGTAC	TTTGAGGTGGAATGATGATG	249	60TD50 ^b
7	GGAAAGAGGTATTAGCTCAC	CATCATCTTTCCTTGTGTC	287	50°C
8	TGGCCACACAATACTCTCTCC	TCATCCGGGTCATGTACTG	929	60TD50 ^{a,b}

E: número de Exón, **pb:** tamaño del amplicón en pares de bases, **Tm:** Temperatura del ciclo de hibridación en la PCR

^a Indica que se añadió a la reacción el aditivo comercial Q proporcionado junto a la *Taq* polimerasa de Quiagen.

^b 60TD50 hace referencia a un protocolo de tipo *touchdown* en el que tras 4 ciclos a 60°C, la temperatura de *annealing* desciende 0,5°C/ciclo hasta alcanzar 50°C. El resto de ciclos hasta completar 35 se realizan a 50°C.

2.8. Análisis de segregación de las mutaciones con la enfermedad en las familias y estudio poblacional.

El estudio de segregación se realizó mediante la técnica de los Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP), ya que las dos mutaciones encontradas eliminaban una diana de restricción pudiendo distinguir el patrón electroforético del alelo normal y del alelo mutado al realizar una digestión con el enzima de restricción adecuado del producto de PCR correspondiente al exón en el que se localiza la mutación. Las digestiones se realizaron siguiendo el protocolo de fabricante del enzima (MBI Fermentas) incubando el producto de PCR del exón correspondiente con el enzima de restricción en el tampón adecuado durante 2h a 37°C. El resultado se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio.

En el caso de la mutación c.758delC encontrada en la familia ADLTE01, el cambio destruye la diana para el enzima de restricción *Dde* I por lo que la digestión con este enzima del producto de PCR del exón 7 produce un patrón electroforético de 2 bandas de 154 pb y 133 pb para el alelo normal y de 1 banda de 287 pb para el alelo mutado.

En el caso de la mutación c.1420C>T encontrada en la familia ADLTE03, el cambio destruye la diana para el enzima de restricción *Nru* I por lo que la digestión con este enzima del producto de PCR del exón 8 produce un patrón electroforético de 2 bandas de 618 pb y 311 pb para el alelo normal y de 1 banda de 929 pb para el alelo mutado.

El estudio de la presencia de estos cambios en la población general se realizó utilizando la misma metodología, a partir del ADN de 60 individuos sanos provenientes de la misma región geográfica que las familias en las que se detectaron las mutaciones: el País Vasco para la mutación c.758delC y el sur de España para la mutación c.1420C>T.

2.9. Análisis genético de las familias ADLTE.

2.9.1. Marcadores utilizados y condiciones de amplificación.

Se escogieron los siguientes marcadores del cromosoma 10q24, flanqueantes del locus *LGI1* según el mapa de Génethon (Dib *et al.*, 1996): D10S185, D10S200, D10S1680, D10S677, D10S1736, D10S577, D10S1758, D10S571, D10S520.

En la tabla 10 del apartado 2.3. se muestran las condiciones de amplificación para cada microsatélite, el rango del tamaño amplificado y el fluoróforo con el que está marcado cada uno. La utilización de tres fluoróforos distintos (Fam, Hex y Tet) (Reed *et al.*, 1994) combinados con los distintos rango de tamaño de cada uno de los marcadores permitieron utilizar una aproximación *multiplex* que aumentó la productividad del análisis (secuenciador ABIPrism 3100 de Applied Biosystems).

2.9.2. Construcción de los haplotipos.

Los genotipos de los distintos marcadores microsatélites se determinaron con los programas GeneScan v3.6 y Genotyper v3.7 (Applied Biosystems). Los haplotipos se determinaron mediante el programa SIMWALK2.83 (Weeks *et al.*, 1995; Sobel *et al.*, 1996), teniendo en cuenta que la penetrancia de la enfermedad es del 70%. La representación gráfica de los haplotipos se llevó a cabo en el programa Cyrillic v2.1 (Cherwell Scientific), donde se comprobó y corrigió manualmente cuando fue necesario la fase de los genotipos.

2.9.3. Análisis de ligamiento.

Para el análisis de ligamiento de la región 10q24 genotipada con la enfermedad en las familias ADLTE01, 02, 04, 06, 07 y 08 se utilizó el programa informático MLINK del paquete LINKAGE (Lathrop *et al.*, 1984; Cottingham *et al.*, 1993). Se acepta la existencia de ligamiento cuando el valor de LOD es mayor a 3 y se excluye el ligamiento cuando el valor de LOD es menor a -2, no pudiendo aceptar ni excluir el ligamiento cuando el valor de LOD se encuentra entre -2 y 3. El modelo de herencia utilizado es el autosómico dominante, con penetrancia del 70% para todas las edades.

2.9.4. Estudio de simulación.

En el estudio de simulación no se incluyeron las familias ADLTE03 y ADLTE05 por tratarse de familias nucleares, mientras que se incluyeron las familias ADLTE04, 06, 07, y 08 y se analizaron utilizando el mismo modelo de herencia que en el caso del análisis de ligamiento. El análisis estadístico se realizó con el programa informático SIMLINK (Boehnke, 1986; Ploughman *et al.*, 1989). La simulación de ligamiento y no ligamiento se realizó para cada familia individualmente y

posteriormente se sumaron los valores obtenidos. El programa SIMLINK proporciona una estimación, basada en el modelo de herencia especificado (en nuestro caso: autosómico dominante, con una penetrancia del 75% y utilizando un marcador con 4 alelos con distintas frecuencias) del valor de LOD medio y máximo que cada familia puede proporcionar para el caso de un marcador ligado y un marcador no ligado. Igualmente, indica la probabilidad de obtener un valor de LOD determinado, arbitrario, a una fracción de recombinación dada, lo que permite establecer los valores de LOD que pueden considerarse como sugestivos de ligamiento para estudios posteriores.

2.10. Búsqueda de polimorfismos.

2.10.1. Región codificante de *LGI1*.

Para la búsqueda de polimorfismos en *LGI1* se amplificaron y secuenciaron los 8 exones del gen tal como se ha descrito en el apartado 2.7. para buscar mutaciones. Se emplearon muestras donadas por el Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana. A fin de optimizar recursos, las 40 muestras a analizar se agruparon en dos *pools* distintos basándonos en la intensidad relativa del amplicón de PCR obtenido. Así se creó un primer *pool* con aquellas muestras de mayor eficiencia de PCR y un segundo con aquellas muestras de menor eficiencia de PCR. Mediante esta aproximación obtuvimos dos secuencias para cada amplicón que fueron analizadas con el programa Sequencing Analysis utilizando la opción “Factura” que permite la detección automática de posiciones ambiguas en las que el pico menor (el alelo raro) tiene una frecuencia superior al 20%.

2.10.2. Región UTR5' de *LGI1*.

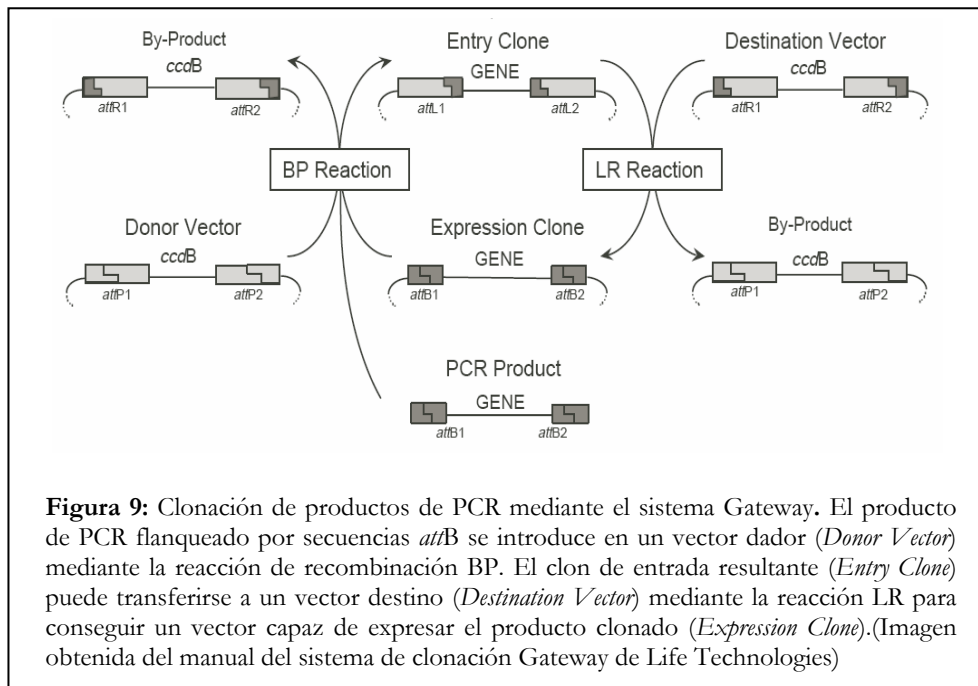
En la búsqueda de polimorfismos en la región UTR5' de *LGI1* también se rastrearon 40 muestras control y de la misma forma que en el apartado anterior, los fragmentos amplificados se agruparon en dos grupos según la eficiencia de amplificación. Tal como se describe en la figura 8 (pg58), se amplificaron fragmentos de 411, 427 y 835pb, los cuales abarcan 1200pb desde el codón de inicio ATG del exón 1 en dirección 3'→5'.

La búsqueda de polimorfismos se realizó comparando las secuencias resultantes de la mezcla de PCR de las 20 muestras con la secuencia de *LGI1* obtenida de las bases de datos pública.

2.11. Sistemas de clonación.

2.11.1. Sistema Gateway. Es una metodología pensada para facilitar la clonación de productos de PCR y la expresión de proteínas ya que sustituye el método tradicional de clonación de digestión con enzimas de restricción y ligación por una recombinación sitio específica. Este sistema proporciona un sistema versátil para transferir segmentos de DNA entre vectores. Una vez en el sistema, los fragmentos pueden transferirse desde un “vector de entrada” a numerosos “vectores de salida” o viceversa según las necesidades. Este sistema se basa en dos reacciones enzimáticas que se esquematizan en la figura 9.

- **Reacción BP**, que consiste en la introducción del gen (flanqueado por sitios *attB*) en el vector dador, conocido como pDONOR, el cual contiene sitios *attP*. Mediante una reacción de recombinación entre los sitios *attB* y *attP* el gen queda introducido dentro del pDONOR, que a partir de ese momento se denomina vector o clon de entrada o pENTRY.



- **Reacción LR**, por la cual el gen que se encuentra clonado en un vector de entrada pENTRY se transfiere al vector destino correspondiente. Se trata de una reacción de recombinación entre los sitios *attL* del pENTRY y los sitios *attR* de un “vector destino”, conocido como pDEST, manteniéndose en todo momento la orientación correcta del gen.

A partir de una genoteca comercial de cDNA de cerebro humano adulto (*SuperScript Human Brain cDNA Library*, Invitrogen), se obtuvo mediante PCR *LGI1^{wt}* para clonarlo dentro de pDONOR mediante una reacción de tipo BP y obtener el clon de entrada llamado pENTRY *LGI1^{wt}*. A partir de los cuales se realizó mutagénesis dirigida para introducir la mutación c.758delC, y por otra parte la reacción LR a pDEST de expresión en células eucariotas y procariotas.

2.11.2. Clonación direccional: por PCR o Subclonación.

- **Obtención del inserto.** En caso de poseer el gen ya clonado en un vector que contiene dianas de restricción flanqueantes compatibles con el vector destino en el que se desea clonar, el procedimiento se denomina subclonación. En este caso, el inserto se obtiene mediante digestión a partir de 10 µg del plásmido del que queremos extraer el inserto, realizando una digestión doble si los enzimas son compatibles con el mismo tampón de reacción o secuencial purificando la reacción por columna (Sigma) entre la primera digestión y la segunda si no lo son. Las digestiones se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, incubando los 10 µg de DNA con al menos una unidad de cada enzima en el tampón proporcionado a la temperatura adecuada al menos 2 horas.

Cuando las dianas de restricción que flanquean el inserto en el plásmido origen no son compatibles con el plásmido destino, se puede obtener el inserto por PCR a partir de una genoteca o de un plásmido con el gen clonado, utilizando cebadores específicos del gen que contengan colas con la secuencia de las dianas de restricción necesarias para la clonación en el vector destino. La reacción de PCR se efectúa con una DNA polimerasa que posea prueba de lectura (actividad exonucleasa 3'>5') como la *Pfu* Turbo de Stratagene según las especificaciones del fabricante: 2,5 unidades de *Pfu* Turbo en tampón de reacción 1x, mezcla de los cuatro dNTPs (ATP, CTP, GTP y TTP) a una concentración final de 200 µM cada uno, 0,5 µM de cada cebador y 50 ng de DNA molde en un volumen de reacción de 50 µl. Las condiciones de amplificación generales son las que especifica el fabricante de la polimerasa con 30 ciclos en los que la temperatura de hibridación de los cebadores es habitualmente

60°C y la temperatura de extensión 68°C ajustando la duración de la extensión por ciclo según el tamaño del inserto (1min/kb). El producto de PCR es comprobado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. A continuación se purifica por columna y es digerido con los enzimas de restricción para la clonación. Antes de ligar los insertos se purifican por columna (Sigma).

Obtención del vector. El vector donde se quiere clonar el inserto ha de ser digerido con los mismos enzimas que el inserto para conseguir la clonación posicional. La digestión se efectúa como se ha expuesto en el punto anterior a partir de 10µg de vector y además de los tampones de las enzimas de restricción se tiene en cuenta la distancia a la que están separados los sitios de restricción. En caso de ser esta distancia menor de 10pb, la digestión también se realiza de manera secuencial.

Tras la digestión del vector el producto se purifica por columna (Sigma) y se defosforila para prevenir la religación del vector vacío. Para esto se incuba el vector digerido con 5 unidades de fosfatasa alcalina (Roche) en el tampón suministrado por el fabricante durante 30min a 37°C. El producto final es nuevamente purificado por columna (Sigma) y cuantificado.

- **Cuantificación:** Ambos productos se cuantifican electroforéticamente en un gel de agarosa al 0,8% estimando la concentración aproximada de vector digerido y defosforilado y de inserto digerido comparando la intensidad de la banda teñida con bromuro de etidio con la del patrón de pesos moleculares y concentración de ADN conocida (REAL, Durviz), que se carga en el mismo gel.

- **Ligación** La ligación del vector y del inserto se lleva a cabo con el sistema de Roche *Rapid DNA Ligation Kit* durante 15 minutos a temperatura ambiente combinando vector e inserto en una relación molar de 1:3 en un volumen final de reacción de 21 µl en presencia de los tampones suministrados por el fabricante y 1 unidad de ligasa T4. Tras la ligación, el producto se purifica con el sistema *High Pure PCR Purification Kit* de Roche eluyendo la columna con 100µl de agua. A continuación se electroporan 15µl.

2.11.3. Mutagénesis dirigida. Se seleccionó el sistema de mutagénesis dirigida de Stratagene, mediante el cual se pueden introducir mutaciones puntuales y eliminar o añadir entre una y quince pares de bases. Este sistema se basa en la amplificación con *Pfu* Turbo del vector completo con cebadores complementarios entre si, y que portan

la modificación a introducir. El tiempo de extensión depende del tamaño del plásmido. Las condiciones de la PCR empleadas se muestran en la tabla 13.

El producto de la PCR es digerido directamente con 1µl de la enzima de restricción *Dpn I* (Fermentas) durante dos horas a 37°C, a continuación se electroporan 2µl del producto de digestión.

Tabla 13. Condiciones de la PCR para la mutagénesis dirigida.

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95°C	30 seg
2	20	95°C	30 seg
		55°C	1 min
		68°C	2 min/Kb
3	1	68°C	15 min

2.11.4. Electroporación.

Este método consiste en abrir microporos en la membrana celular de la bacteria mediante un leve pulso de corriente eléctrica, con el objetivo de facilitar el paso del DNA plasmídico al interior de la bacteria. Se añade la muestra a electroporar a un vial con células *E. coli DH 5α* electrocompetentes, se mezclan levemente y se transfieren a la cubeta de electroporación. Se electropora utilizando 1,7mV, resistencia externa en serie de 400Ω. Se recogen las células lavando con 1ml de SOC y se incuban a 37°C de 30 a 60 minutos. Finalmente se siembran en placas de LB agar (1% Bactotripton, 1% NaCl, 0,5% Extracto de levadura, pH 7,2% agar) suplementado con el antibiótico correspondiente para la selección de colonias positivas portadoras de la nueva construcción (100 mg/l si es ampicilina y 50 mg/l si es kanamicina). Se incuban a 37°C toda la noche.

2.11.5. Purificación del ADN plasmídico.

Algunas colonias individuales crecidas en las placas con el antibiótico de selección se crecen de manera independiente en medio LB líquido suplementado con antibiótico correspondiente a 37°C, en agitación durante 8-12 horas. Para la comprobación de la ligación por análisis de restricción y/o por secuenciación directa, el DNA plasmídico se purifica a pequeña escala con un sistema comercial de Miniprep (Qiagen, Eppendorf, Marligen).

2.12. Generación de ratones genéticamente modificados.

2.12.1. Preparación de las construcciones y microinyección.

Se digirieron 20µg de las construcciones pTSC21K-LGI1-wt y pTSC21K-LGI1-01 con *NotI* toda la noche a 37°C. Las digestiones se corrieron en un gel de 0,8% de agarosa con bromuro de etidio y la banda correspondiente al transgén se cortó y purificó utilizando el kit *Gene Clean Turbo* de Q-BIOgene.

La microinyección del transgen se llevó a cabo en zigotos fertilizados obtenidos de hembras B6D2F1 y fueron reimplantados en hembras Swiss pseudogestantes. Todo el proceso se llevó a cabo según el protocolo del Servicio de Transgénesis del IBV.

2.12.2. Identificación y obtención de tejido de los ratones.

A los 8-10 días de nacer se marcaron los ratones, amputándoles uno o dos dedos empleando el código mostrado en la figura 10. Con este sistema como máximo quedarán afectados dos dedos, los cuales siempre pertenecerán a manos distintas. Se pueden numerar hasta 99 ratones, después de lo cual empezamos de nuevo con el número 1 añadiendo una letra en la lista, A en la primera ronda, B en la segunda etc. Al mismo tiempo se les cortó aproximadamente 5mm de cola para la extracción de ADN genómico, lo cual se realizó según se señala en el apartado 2.4.2.

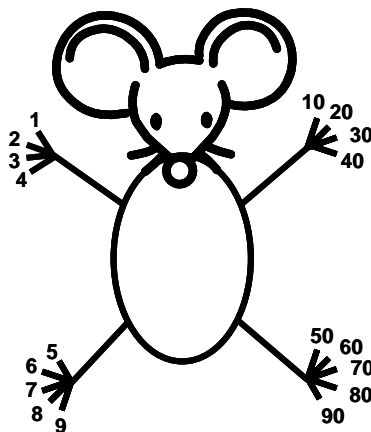


Figura 10: Representación esquemática de la numeración de los ratones por amputación de dedos. El dibujo muestra la panza de un ratón y cada dedo tiene un número asignado, necesitando sumar dos dedos para formar un número no redondo (ej. 15: el 10 más el 5).

2.12.3. Amplificación del transgén por PCR.

La detección del transgén se hizo a partir de ADN genómico de ratón por PCR, utilizando un cebador directo específico del plásmido pTSC21K (nº10 de la tabla 11) y un cebador reverso en el exón 2 de *LGI1* (nº11 de la tabla 11). La reacción de PCR se realiza según el protocolo 60TD50 (ver detalle en la tabla 9, pg57) y el fragmento obtenido es de 300pb.

2.13. Caracterización de los ratones transgénicos.

2.13.1. Cuantificación del número de copias de transgén.

El número de copias de transgén insertados en el genoma se analizó por PCR cuantitativa o a tiempo real. Se emplearon sondas TaqMan marcadas con el fluoróforo FAM y TAMRA (6-carboxy-fluorecein y 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine respectivamente) (Applied Biosystems). Los cebadores de una de las reacciones se diseñaron contra la región plasmídica del transgén y como gen control o *housekeeping* se utilizó el gen actina.

Las reacciones para cada muestra se efectuaron por triplicado y la cuantificación se hizo utilizando el método comparativo $\Delta\Delta C_t$ (*cycle threshold* o umbral del ciclo) (Livak *et al.*, 2001) donde para cada muestra se resta el C_t del gen control al C_t del transgén, restando esta diferencia a su vez a la diferencia obtenida en la muestra control o silvestre. Previo a la cuantificación se normalizó la concentración de las muestras con la reacción de β -actina eligiendo una de las muestras como control.

Para cuantificar la expresión del transgén, se verificó la compatibilidad de ambas reacciones TaqMan analizando sus pendientes. En la Figura 11 se muestra la recta originada por la diferencia de pendiente de ambas reacciones. Se observa que la pendiente de esta recta es menor a 0,1 por lo que se asume que la eficiencia de ambas reacciones es comparable.

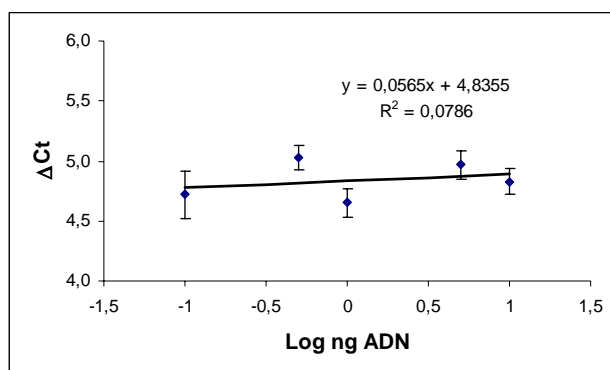


Figura 11: Análisis de la eficiencia de las dos reacciones TaqMan, Actina y transgén, representado por el logaritmo de la cantidad de ADN utilizada en la reacción *versus* la diferencia de Ct (ΔC_t) entre cada reacción. La ecuación de la línea de tendencia nos muestra una pendiente menor a 0,1 , lo cual denota que las eficiencias de ambas reacciones son comparables.

Todos los cebadores se diluyeron a una concentración de 10 μ m, cada reacción se llevó a un volumen total de 15 μ l según las recomendaciones del proveedor (tabla 14) y las condiciones de PCR indicadas en la tabla 15. La reacción se llevó a cabo en un termociclador ABI PRISM 5700.

Tabla 14: Reacción de la PCR a tiempo real

Reactivo	Volumen
Cóctel	7,5 μ l
Cebadores F+R	1,5 μ l
Sonda TaqMan	0,6 μ l
Agua	0,4 μ l
ADN	5 μ l
Volumen final	15 μ l

a: *Taqman universal PCR master mix*, no *AmpErase*

b: concentración del ADN genómico: 10 μ g/ μ l.

Tabla 15. Condiciones para la PCR a tiempo real.

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95°C	10 min
2	40	95°C	15 seg
		60°C	1 min

2.13.2. Cuantificación de la expresión de ARNm del transgén.

La cuantificación de la expresión del transgén se realizó a nivel de ARNm. Se extrajo ARN de cerebro de ratón según el protocolo descrito en el apartado 2.5., se trató con ADNasa (Fermentas), se cuantificó en el espectrofotómetro y se empleó 1µg como molde para la primera reacción de RT-PCR con hexámeros aleatorios (Roche) y la polimerasa transcriptasa reversa (*Expand Reverse Transcriptase*, Roche) según las indicaciones del proveedor, en un volumen final de 20µl.

La segunda reacción de la RT-PCR se llevó a cabo con sondas TaqMan (*Assays-by-Design*, Applied Biosystems) empleando 1µl de la primera reacción y tal como se ha explicado en el apartado anterior. La sonda para el transgén se diseñó en la región de los exones 2 y 3 de LGI1 y como reacción control se utilizó el gen GAPDH murino cuyos cebadores y sonda también adquirimos de Applied Biosystems.

Se comparó la eficiencia entre ambas reacciones tal como se muestra en la figura 12 y se observó una pendiente menor a 0,1.

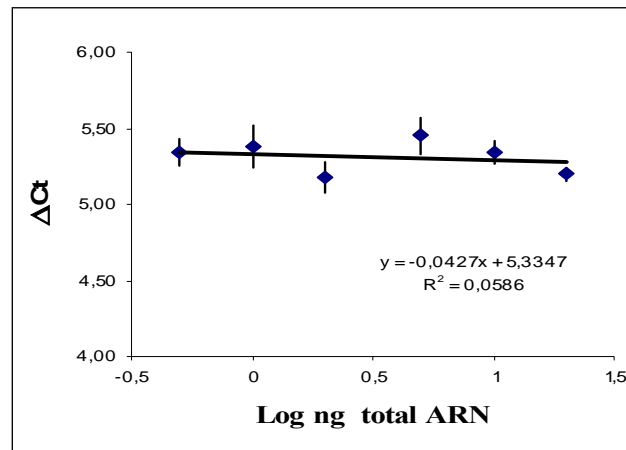


Figura 12: Comparación de la eficiencia de las reacciones GAPDH y LGI1 representada como la diferencia de Ct (ΔC_t) entre ambas reacciones *versus* cantidad de ARN (ng) empleado en la reacción. La ecuación de la línea de tendencia nos muestra una pendiente menor a 0,1, lo cual denota que las eficiencias de ambas reacciones son iguales.

2.14. Estudio de comportamiento.

En la tabla 16 se muestra el diseño experimental utilizado para llevar a cabo la serie de pruebas y ensayos que se detallan a continuación. Se analizaron ratones de las dos líneas transgénicas y como control se emplearon ratones silvestres. Todos ellos tenían la misma edad, 6 meses, en el momento del estudio, si bien éste se llevó a cabo en dos tandas por el elevado número de individuos y para posibilitar su ejecución en el mínimo tiempo. Ambos sexos se agruparon para el análisis de los datos tras comprobarse que no existían diferencias entre ellos. A la hora de manipular los animales sin embargo, sí se tuvo en cuenta los sexos y se tuvo cuidado en llevar a cabo las distintas pruebas primero con las hembras y después con los machos, tras limpiar los aparatos. En la tabla 17 se detalla la composición de cada subgrupo.

Tabla 16: Resumen del diseño experimental de la batería de pruebas.

DÍA	TEST	Nº ensayos / día	T / ensayo	
1	Peso			
	Campo abierto	1	10'	
2	Laberinto	1	5'	
3	Fuerza de agarre	10 (5+5)		
	Rota-Rod	5	4 rpm 5'	
4	Rota-Rod	5 1	4,7,10,14,19 rpm 4-40 rpm	
5	DESCANSO			
6				
7	Morris1	Visual	4	60'' 30'' en P
8			4	
9			4	
10		Espacial	4	60'' 30'' en P
11			4	
			4	
12		Probe 1	1	60''
13			Probe 2	1
	Peso			

Tabla 17: Ratones empleados para el estudio de comportamiento.

	Wt	L75	L15
♂	9	7	7
♀	7	5	5
Total	16	12	12

wt: *wildtype* o ratón control.; L15: línea 15; L75: línea 75; ♂: grupo de ratones machos; ♀: grupo de ratones hembras.

2.14.1. Proveedores y sistemas empleados en los estudios de comportamiento.

La piscina, el laberinto elevado, el sensor de la fuerza de agarre (Bioseb), y el rota-rod (LSI-Letica) fueron adquiridos a Panlab. El campo abierto fue manufacturado por el equipo de mantenimiento del IBV.

En los ensayos de campo abierto, laberinto elevado y Morris el sistema informático empleado para adquirir y analizar los datos es de Panlab. Se utilizó el programa SMARTv2.0 para analizar los datos y una cámara Sony SSC-DC398P colocada a 2m de altura sobre los aparatos para grabar la trayectoria de los ratones. Como preparación de cada experimento han de definirse las distintas zonas del campo a grabar para que el programa pueda analizar los parámetros según las distintas regiones y exportar los datos a una hoja de cálculo Excel.

2.14.2. Campo abierto.

El campo abierto es una caja de 50 por 50cm y 40cm de altura (figura 13a). El animal se suelta en el centro (Figura 13b), dejando que se mueva libremente durante 10 minutos, tiempo durante el cual se filma y graba la trayectoria del ratón. Previamente se delimitan dos zonas en el campo abierto: una exterior o periférica de 6cm y otra interior.

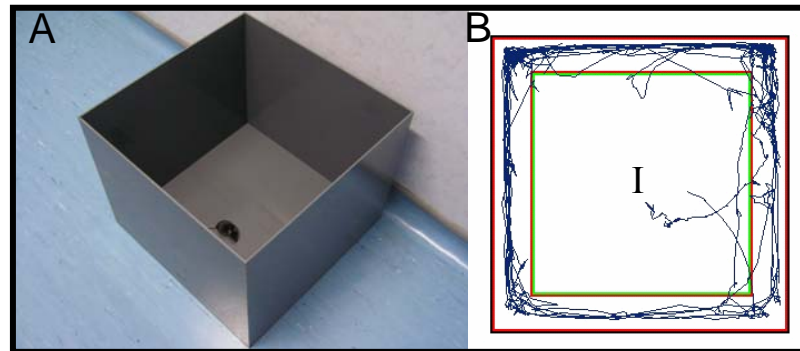


Figura 13: Campo abierto. **A:** Caja de 50cm x50cm donde se lleva a cabo la prueba. **B:** Un ejemplo de la trayectoria de un ratón captada por el programa informático. En verde la zona interior y en rojo la zona periférica, ambas delimitadas en el programa antes de registrar los datos. **I:** inicio del recorrido.

2.14.3. Laberinto elevado en cruz.

El laberinto es una cruz con dos brazos abiertos y otros dos cerrados (Figura 14a), todo ello a 40cm de altura del suelo. Los brazos son 60cm de largo, 6cm de ancho y las paredes de una altura de 14cm. El esquema sobre el que se analizan los datos se muestra en la figura 14b, donde se diferencian los brazos abiertos de los cerrados, los extremos de éstos y el centro de la cruz.

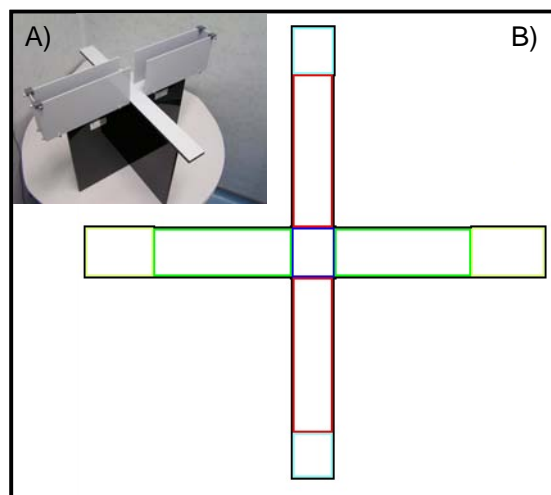


Figura 14: Laberinto elevado. **A:** Imagen de la cruz elevada del suelo con dos brazos abiertos y otros dos cerrados. **B:** Delimitaciones de las distintas zonas de interés para el análisis de datos reflejada con distintos colores. Se distinguen los brazos abiertos de los cerrados, así como la zona central de la cruz. En nuestro caso no ha sido necesaria la determinación de los extremos de los brazos tal como se indican en la figura.

La forma de proceder en este test es dejando el ratón en el centro de la cruz y recogiendo los datos de su trayectoria durante 5min. A menudo, el ratón sólo alargará una pata delantera a otra zona, lo que no se considerará una intrusión, pues ésta sólo se dará cuando las tres cuartas partes del animal se hallen dentro de la zona.

2.14.4. Fuerza de agarre.

Con esta prueba hemos medido la fuerza realizada por los miembros anteriores de los ratones. Se coge al ratón de la cola y se deja que agarre la red metálica con las patas anteriores, tirando suavemente del animal hacia atrás hasta que suelte la red. El aparato, a través del sensor de la red metálica, registra el pico más alto de la fuerza (dada en gramos) ejercida por el animal. La figura 15 muestra el equipo utilizado.

En cada una de las dos rondas, cada ratón se pasó sin soltarlo por el experimentador por la red cinco veces, por lo que se registraron en total 10 picos.

Figura 15: Fuerza de agarre. Aparato con el que se mide la fuerza ejercida por los ratones con las patas anteriores. La red metálica donde se agarran los ratones se sujeta a la unidad medidora a través de un sensor.



2.14.5. Rota-rod.

Esta es una prueba motora en la que se analiza la habilidad del ratón tanto en mantenerse en equilibrio encima de una rueda giratoria (figura 16) como su resistencia. En el primer día del test, a los ratones se les enseña a caminar encima de la rueda giratoria a una velocidad mínima fija (4rpm). En el segundo día se incrementa la velocidad de la rueda en cada ensayo, 4rpm, 7rpm, 10rpm, 14rpm y 19rpm. En un segundo protocolo se aumenta la velocidad progresivamente de 4 a 40rpm durante dos minutos y se anota la velocidad máxima a la que ha llegado a correr el ratón.



Figura 16: Rota-rod. Aparato rota-rod con el que se puede realizar un ensayo con 5 ratones a la vez. Cuando el ratón cae de la rueda giratoria (en negro) las espátulas (blancas) caen y paran automáticamente el cronómetro.

2.14.6. Test de Morris.

El test de Morris, también llamado de escape, es una piscina de 1m de diámetro con una plataforma de escape a la que el ratón puede encaramarse (Figura 17a). El agua se hace opaca con latex (10ml/l agua) de forma que la plataforma sea invisible a los ojos del ratón. Cuando se desee hacer visible la plataforma se colocará una señal encima.

Con el objetivo de analizar la capacidad de aprendizaje y memoria de los ratones, llevamos a cabo este test que consta de dos partes: la visible, donde se ve la plataforma, y la invisible o espacial, donde el ratón no ve la plataforma, pero donde existen unas pistas o claves exteriores que ayudarán al ratón a orientarse para alcanzar la plataforma (Figura 17b).

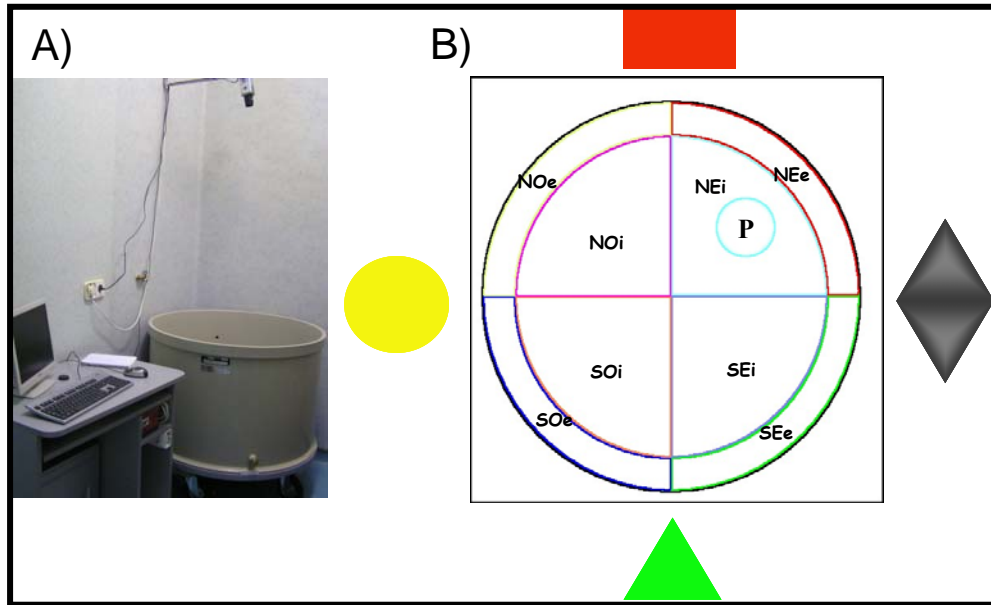


Figura 17: Test de Morris. **A:** Visión completa del equipamiento: el sistema informático, la piscina y la videocámara. En el momento del ensayo la piscina se rodea de una cortina. **B:** Esquema de las zonas delimitadas en la piscina, así como las pistas exteriores para la prueba invisible o espacial. **P:** plataforma de escape; **N:** norte; **S:** sur; **E:** este; **O:** oeste; **i:** interno; **e:** externo.

En estas pruebas al ratón se le da un minuto para que encuentre la plataforma. Transcurrido este tiempo, haya o no encontrado la plataforma de escape, se le mantiene en ella durante medio minuto. Se realizaron 4 pases cada día durante tres días para cada prueba. Como se observa en la figura 17b la superficie de la piscina se dividió en cuatro cuadrantes y la zona periférica también se diferenció de la interior. En cada pase el animal se soltó en un cuadrante distinto, manteniendo la localización de la plataforma. En la figura 18 se muestra la trayectoria adquirida por el programa informático en dos ejemplos de pruebas visibles. En la figura 18a, el ratón se ha soltado en el cuadrante SEe (sureste exterior), punto indicado con una B (*beginning*), y no ha conseguido alcanzar la plataforma en un minuto, a pesar de haberla rozado. En un pase posterior del mismo ratón mostrado en la figura 18b, se observa que el ratón ha alcanzado casi en línea recta la plataforma (E: *end* o final del trayecto).

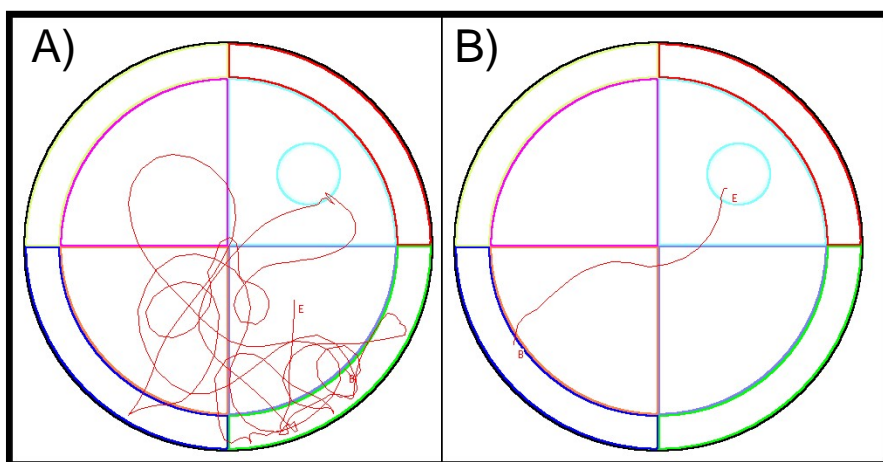


Figura 18: Representación de dos ensayos de la prueba visible. **A:** El primer ensayo del ratón. Nótese que, si bien ha tocado la plataforma de escape, no ha podido encontrarla. **B:** cuarto y último ensayo visible del mismo ratón. El círculo azul representa la plataforma de escape visible. **b:** *beginning* o comienzo de la trayectoria; **e:** *end* o fin de la trayectoria.

En un último protocolo llamado *Probe*, se procede a retirar la plataforma flotante de la piscina manteniendo las claves externas y se mide el tiempo transcurrido en cada zona de la piscina incluyendo la región que fuera plataforma, esperándose una preferencia del ratón por el cuadrante de la plataforma. Se llevó a cabo un *Probe* tras el último test espacial y un segundo *Probe* al día siguiente.

2.15. Determinación del tiempo de activación del promotor *Thy1.2*.

Se emplearon ratones de ambas líneas Thy-LGI1-01 para obtener embriones de 11, 12, 14, 15 y 17 días y ratones P0 mediante cesárea de las progenitoras. El saco vitelino se procesó para la obtención de ADN (según el mismo protocolo de extracción a partir de cola de ratón) y posterior genotipaje, mientras que los embriones se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C o se procesaron en el momento para la obtención de ARN.

Según los resultados del genotipaje se diseñaron los análisis de RT-PCR a tiempo real de forma que se cuantificó la cantidad de ARNm del transgén relativa a la cantidad de ARNm de *LGI1* en los embriones de la misma edad no transgénicos o controles. El ensayo se llevó a cabo según se explica en el apartado 2.13.2. Los datos,

dados en medias \pm DS, son resultado de entre 2 y 4 muestras y dos ensayos RT-PCR cada uno.

Llegado a este punto tuvimos la posibilidad de utilizar una línea de ratón que sobreexpresa la proteína fluorescente GFP dirigida también por el promotor *Thy1.2*. De la misma forma explicada anteriormente, procesamos embriones E9, E17 y E19, pero esta vez analizamos los embriones por RT-PCR simple, ya que el transgén expresado así nos lo permite. Se empleó 1 μ g de ARN total como molde para la primera reacción de RT-PCR con hexámeros aleatorios (Roche) y la polimerasa transcriptasa reversa (*Expand Reverse Transcriptase*, Roche) según las indicaciones del proveedor, en un volumen final de 20 μ l. Para la segunda reacción se emplearon los cebadores n°12 y n°13 de la tabla 11, con lo que se consiguió amplificar una banda de 100pb en las muestras de embriones transgénicos en las que la expresión del transgén se halle activada.

2.16. Análisis de proteínas – Electroforesis bidimensional.

- **Hidratación de la tira.**

Se emplearon tiras IPG (gradiente del punto isoelectrico) (*Immobiline DryStrip*, Amersham Biosciences) de 13cm con rango de pH 4-7, las cuales se hidrataron en solución de hidratación (386,5 μ l tampón de lisis, 1 μ l azul bromofenol, DTT 20mM, 0,5% anfolitos de Amersham Biosciences) durante toda la noche

- **Electroenfoque ó 1º dimensión.**

En esta primera etapa se separan las proteínas según su punto isoelectrico. Se cargaron 200 μ l de proteína y se aplicó el programa de la tabla 18.

Tabla 18: Condiciones utilizadas en el electroenfoque ó 1º dimensión de la electroforesis bidimensional.

Paso	Modo Voltaje	Voltaje (V)	Duración (h:min)	Volt-horas (Vh)
1	Gradiente	500	0:01	10
2	Gradiente	4000	1:30	3400
3	Paso a paso	8000	1:50	13500
Total		0	3:50	17000

- **SDS-PAGE ó 2º dimensión.**

Para la separación de las proteínas según su tamaño molecular se prepararon geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 12% (acrilamida/ bisacrilamida 29:1) (Genaxis). El método utilizado fue el de la electroforesis discontinua de Laemmli según el cual el gel de poliacrilamida está constituido por una región inicial denominada “Gel Empaquetador” (*Stacking*) polimerizado en tampón Tris-HCl a pH 6,8 en el que la mezcla de proteínas en tampón de carga SB (0,3 M Tris-HCl, pH 6,8, 5% SDS, 50% glicerol, 5% β -Mercaptoetanol y 0,2 mg/ml Azul de Bromofenol) (tampón añadido previamente en la agarosa que cubre la tira IPG) se acumula en una única banda y una región denominada “Gel Separador” (*Resolving*) polimerizado en tampón Tris-HCl a pH 8,8 en el que las proteínas se separan en función de su tamaño molecular.

Tras agitar la tira IPG en tampón equilibrado con DTT (50mM Tris-HCl pH8,8, 7M Urea, 30% glicerol, 2% SDS, 2% DTT en fresco), dos veces durante 10min y otras dos veces en tampón equilibrado con Iodoacetamida (50mM Tris-HCl pH8,8, 6M Urea, 20% glicerol, 2% SDS, 2,5% Iodoacetamida en fresco), se colocó la tira IPG en el gel polimerizado y se realizó la electroforesis a voltaje constante (65V) hasta dejar caer el tampón de carga en el tampón de Laemmli (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM Glicina, 0,1% SDS).

Una vez concluida la electroforesis, los geles se lavan con agua abundante y se tiñen con *Comassie* (Simply Blue Safe Stain, Invitrogen) hasta que aparezcan los puntos, después de lo cual se vuelve a lavar el gel con agua para eliminar el exceso de colorante. Por último, los geles se escanearon y guardaron como imágenes con gran resolución en formato *tiff* con el programa Photoshop de Windows.

- **Análisis de imagen.**

El análisis de imagen de los geles bidimensionales se realizó con el programa informático PDQuest (Bio-Rad). Las imágenes de los geles para cada análisis se normalizaron contra la suma total de las intensidades de todos los puntos válidos en el gel bidimensional. Esta forma de normalización del programa PDQuest está diseñada para corregir pequeñas diferencias en la carga de proteína o intensidad de marcaje en los distintos geles. De esta forma, el valor cuantitativo para cada punto representativo de una proteína, se define como la intensidad de este punto respecto a la suma total de las intensidades de todos los puntos válidos en el gel. La detección de los puntos se hizo de forma automática primeramente, determinando los puntos de menor y mayor

intensidad, y posteriormente de forma manual para refinar el análisis. Tras *matchear* los puntos de todos los geles, los valores cuantitativos y cualitativos de los puntos se pasaron a una hoja Excel, donde se procedió a su análisis descartando previamente los puntos de calidad baja (<75 en un rango de 0 a 100).

2.17. Análisis del nivel de expresión de los genes p75^{NTR}, NogoR y Lingo1 en los ratones transgénicos.

Los niveles de expresión de los genes p75^{NTR}, NogoR y Lingo1 se cuantificaron a nivel de ARNm por RT-PCR a tiempo real de la misma forma que en el apartado 2.13.2. Los cebadores y sondas TaqMan para p75^{NTR} y NogoR fueron adquiridos a Applied Biosystems (*TaqMan Gene Expresión Assays*), mientras que para Lingo1 se diseñaron específicamente según el protocolo de *Custom TaqMan Gene Expresión Assay service*. Como gen endógeno control se utilizó el gen GAPDH murino. Tal como se hizo para el ensayo GAPDH/LGI1, se comprobó la compatibilidad de las reacciones para el empleo del método ΔC_t como se muestra en la figura 19.

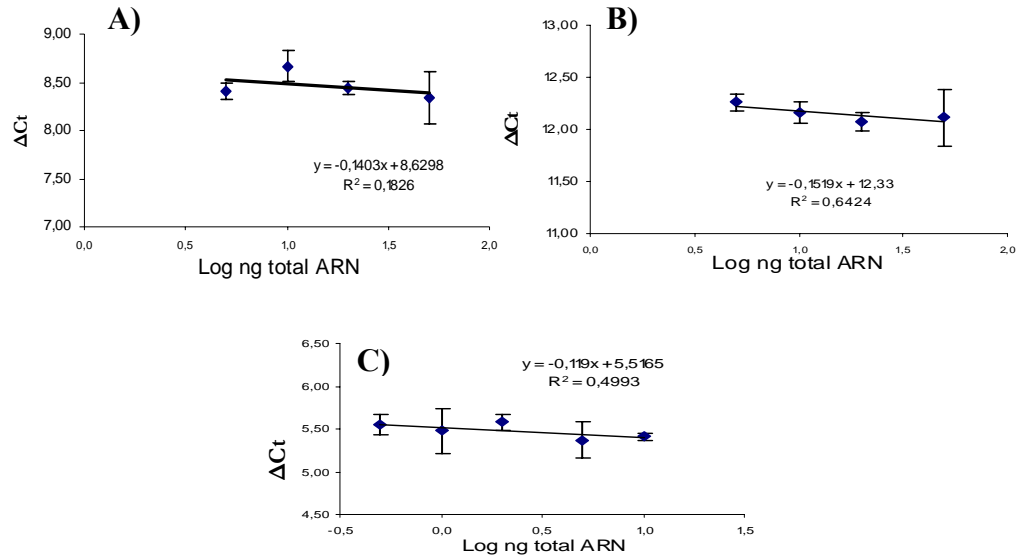


Figura 19: Comparación de la eficiencia de las reacciones p75^{NTR}, NogoR y Lingo1 con GAPDH representada como la diferencia de Ct (ΔC_t) entre la reacción control GAPDH y

cada una de las otras reacciones *versus* cantidad de ARN (ng) empleado en la reacción. La ecuación de la línea de tendencia para cada comparación nos muestra una pendiente menor a 0,1, lo cual denota que las eficiencias de ambas reacciones son iguales. **A:** Reacciones del gen p75^{NTR} y GAPDH; **B:** Reacciones del gen NogoR y GAPDH; **C:** reacciones de Lingo1 y GAPDH.

2.18. Análisis de la sensibilidad de los ratones transgénicos a los convulsivos AK y PTZ.

Con el fin de determinar la dosis de inyección de ambos fármacos se procedió a inyectar distintas dosis, 10, 20 y 30 mg/Kg para AK (Ácido Kaínico) y 30, 45 y 60mg/Kg para PTZ (Pentilenetetrazol) en 15 y 8 ratones respectivamente. Se eligieron las dosis más bajas para ambos fármacos por resultar letales en la mayoría de los casos el resto de las dosis.

Inyectamos de forma intraperitoneal 10mg/Kg de AK (Sigma) en 38 ratones y 30mg/Kg de PTZ (Sigma) en 43 ratones de 4 meses y medio de edad. En la tabla 19 se muestra el número de ratones empleados en el experimento para cada grupo: control o *wildtype*, L75 y L15. Nada más inyectados los ratones con los fármacos, se depositaron en la caja de la prueba de Campo Abierto dividida en cuatro espacios para este experimento, de forma que fue posible filmar con una cámara de vídeo desde arriba cuatro ratones a la vez durante dos horas, si bien los datos mostrados en este trabajo reflejan el análisis de la primera hora al no aportar cambios la segunda hora. Los tres tipos de crisis registrados fueron los siguientes:

- *Wet Dog Shakes*: este término se refiere, tal como indica el nombre, a las sacudidas que hace un perro cuando sale del agua, por lo que se emplea cuando el ratón se sacude enérgicamente durante 1 ó 2 segundos.
- Crisis clónicas: consisten en sacudidas bruscas, amplias y rítmicas de uno o varios miembros.
- Crisis tónicas: consisten en una hipertonia generalizada.

Los vídeos se analizaron mediante una escala de Racine (Racine, 1972) modificada, la cual nos permitió medir tres parámetros: el tiempo al que se da la primera crisis, la duración del estupor postcrítico y el tanto por ciento de los ratones de cada grupo con algún tipo de crisis. Cuando un ratón no ha sufrido ninguna crisis se le da el máximo tiempo (3600sg) al analizar el tiempo de inicio de las crisis.

Tabla 19: ratones empleados en la inducción de crisis por AK y PTZ.

	Sexo	Wt	L75	L15
AK	♂	7	7	3
	♀	9	7	10
	Total	16	14	13
PTZ	♂	6	4	3
	♀	13	8	4
	Total	19	12	7

AK: ácido kaínico; **PTZ:** pentilenetetrazol; **wt:** grupo wildtype o control; **L75:** grupo línea 75; **L15:** grupo línea 15. ♂: ratones machos; ♀: ratones hembras.

Aún no siendo posible determinar la inconsciencia del animal analizado, hemos podido registrar el momento en el que se daba un primer movimiento normal, no convulsivo que nos indicase el fin de la crisis. La duración del estupor post crítico, definida como el tiempo que permanece inconsciente el ratón tras una crisis, medida de esta forma puede ser reflejo de la severidad de la crisis.

2.19. Análisis estadístico.

Los resultados del presente trabajo se expresaron como la media \pm DS (desviación estándar de la media). En los experimentos donde se ha llevado a cabo un análisis estadístico de los datos, éste se realizó utilizando la función prueba t de Student de dos colas no pareada de la aplicación Excel de Windows. Para hallar las diferencias estadísticamente significativas siempre hemos comparado el grupo control (*wildtype*) con la L75 o con la L15. Los resultados han sido representados en gráficas y en ellos se muestra la $m \pm DS$. Los asteriscos (*) representan que existe diferencia estadísticamente significativa de cada grupo (L75 ó L15) con respecto al grupo Control. Se consideró un nivel de $p < 0,05$ como punto de mínima diferencia significativa en cada comparación, y el nivel de $p < 0,001$ como punto óptimo de diferenciación significativa.

2.20. Mantenimiento y obtención de embriones de pez cebra.

Los huevos fecundados de pez cebra fueron incubados a 28°C en agua destilada con 60µg/ml de sal de mar y a diferentes lapsos de tiempo se recolectaron algunos de ellos, los que fueron fijados o congelados a -80°C para su posterior uso. En el caso de embriones de 36hpf o mayores, se añade PTU (0,003% 1-phenyl-2-thiourea) en medio *Danieau* (58 mM NaCl, 0,7 mM KCl, 0,4 mM MgSO₄, 0,6 mM Ca(NO₃)₂, 2,5 mM HEPES, pH 7,6) al agua antes de las 24h de desarrollo con la finalidad de prevenir la pigmentación. Los embriones menores a 24h fueron decorionados a mano, mientras que al resto se le añadió 1mg/ml de Tripsina en PBS durante 20-30min en agitación para ese fin.

2.21. Síntesis de sondas ARN.

De la genoteca de ADNc de *D. rerio* en el plásmido pCMV-SPORT6.1 (diseñado para preparar librerías genómicas, Invitrogen) escogimos el clon que contiene *lgi1* para preparar las sondas sentido y antisentido de ARN. Digerimos el vector que contiene el clon con *EcoR* I para generar una sonda larga (abarca la totalidad del ADNc clonado) y con *Nco* I para crear una sonda más corta (unas 800pb). La sonda antisentido se obtuvo cortando el clon con *Xho* I. Tras la digestión, los productos se purificaron con el kit de purificación de PCR (Qiagen) y se procedió a la transcripción *in vitro* y marcaje con digoxigenina (Dig) según las instrucciones del fabricante (*DIG RNA Labeling Kit*, Roche), empleando el ARN polimerasa T7 para las sondas antisentido y el promotor SP6 para la sonda sentido. El producto de ARN se purificó con el kit *mini Quick Spin RNA Columns* (Roche) y seguidamente se comprobó la integridad del ARN en un gel de agarosa al 0,8%.

El resto de las sondas utilizadas en este trabajo fueron cedidas por el laboratorio del Dr. Carmeliet (Universidad Católica de Lovaina, Bélgica): *Islet*, *Gap43*, *Prox1* y *Sim1*.

2.22. Hibridación *in situ* sobre embriones enteros de *D. rerio*.

Los embriones de diferentes estadios de desarrollo se fijan en paraformaldehído (PFA) al 4% a 4°C durante toda la noche. Se lavan los embriones en PBST (PBS con 0,1%Tween) antes de transferirlos a MeOH para eliminar los lípidos, se incuban en MeOH durante toda la noche y se rehidratan con sucesivos lavados de PBST con

MeOH, disminuyendo la proporción de MeOH hasta eliminarlo completamente (o lo que es lo mismo, aumentando la proporción de PBST: 25%, 50%, 75% y 100% de PBST). Previo a la hibridación, se digieren los embriones con proteinasa K (Boehringer) suavemente (19µg/ml) de 10 a 30 minutos, dependiendo del estadio de desarrollo. Se vuelven a fijar en PFA (paraformaldehído) 4% por 20min y lavar en PBST y después en tampón de hibridación (50% formamida, 5X SSC, 50 µg/ml heparina, 500 µg/ml tRNA de levadura *Torula* y 0,1% Tween-20).

La prehibridación se lleva a cabo a 65°C en tampón de hibridación durante 3h. A continuación, se desnaturaliza la sonda a 80°C durante 5min y se añade a los embriones para la hibridación a 65°C durante toda la noche. Al término de la hibridación, los embriones se lavan con soluciones SSC a distintas concentraciones en tampón de hibridación y posteriormente se realizan otros lavados sucesivos hasta dejar los embriones en PBST para bloquearlos después en 2% de suero (gota serum, Dakocytomation) en PBST durante 1h. Finalmente, se incuban con el anti-Dig-AP (anticuerpo anti-digoxigenina con conjugados de fosfatasa alcalina) en una dilución 1:5000 después de lo cual se elimina la solución de anticuerpo y se lavan con PBST primero y después con tampón AP (100mM Tris-HCl pH 9,5, 50mM MgCl₂, 100mM NaCl y 0,1% Tween-20).

Para el revelado, se incubaron los embriones con el sustrato para fosfatasa alcalina NBT (*nitro blue tetrazolium*, (75 mg/ml) y BCIP (*5-Bromo-4-chloro-3-indolyl galactopyranoside* (50mg/ml)) (Sigma) en tampón de detección AP (100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 100mM Tris-HCl pH 9,5), después de lo cual los embriones fueron lavados 2 veces por 5 min en PBST y refijados.

2.23. Inmunomarcaje sobre embriones enteros de *D. rerio*.

Embriones de 2 y 3dpf fueron fijados en paraformaldehído (PFA) al 4% a 4°C durante toda la noche y se lavaron en PBST (PBS con 0,1%Tween). Posteriormente se transfirieron a MeOH para su posterior uso. Se lavaron en PBST por 30min antes de pasarlos a acetona a -20°C durante 7min. Se lavaron esta vez en 1%BSA, 1%DMSO/PBS durante 60min, tras lo cual se incubaron con el anticuerpo primario diluido en 1%DMSO/PBS (1:100 para *Znp1* (*Zin-Naphthopyr1*) y 1:1000 para *AcT* (Alfa Acetil Tubulina), Sigma) durante 5h. Se volvieron a lavar en 1%BSA, 1%DMSO/PBS durante 60min para incubar con el anticuerpo secundario biotinilado (anti-ratón de cabra) diluido 1:250 en 1%DMSO/PBS durante toda la noche.

Al día siguiente, tras lavar los embriones dos veces en 1%BSA, 1%DMSO/PBS durante 1h, se incubaron en la solución comercial de avidina/biotina (Vectastain ABC Elite Kit), posteriormente en tampón sodio acetato (50mM, pH5,0) y finalmente en solución de marcaje AEC. Todo ello siguiendo las indicaciones del proveedor. La reacción se paró con sucesivos lavados de PBS y los embriones se guardaron en 50% glycerol/PBS a 4°C.

2.24. Inhibición de LGI1 en *D. rerio* por oligos antisentido morfolinos.

Los morfolinos se adquirieron de GeneTools y se guardaron a -20°C a 2mM. En la tabla 20 se muestran las secuencias de estos oligonucleótidos. La inyección se realizó en un principio con tres dosis: 400µM, 700 µM y 900µM (diluido con rojo fenol en medio Danieau). Sin embargo, al observar el mismo fenotipo con los tres, se escogió la más baja para los experimentos subsecuentes con el objetivo de evitar una posible toxicidad. El morfolino AUG o de inicio se diseñó contra la secuencia de inicio de transcripción de *zLGI1*, mientras que el morfolino E3I3 (exón3; intrón3) se diseñó para bloquear el sitio de procesamiento entre el exón 3 y el intrón contiguo 3.

Tabla 20: Oligonucleótidos morfolinos utilizados para inhibir la expresión de *zLGI1*

Nombre	secuencia
MO_AUG_LGI1	CAAACACATCATCCCGGACACACAG
MO_E3I3_LGI1	ACTGCTGTTACTCACGATACTCCAG

2.25. Sobreexpresión de LGI1 en *D. rerio*.

2.25.1. Sobreexpresión de LGI1 por ADN.

La construcción pGFP-LGI1 (apartado 2.2.) con el promotor CMV lleva el ADNc de *LGI1* humano fusionado a la proteína fluorescente GFP. Se cuantificó el ADN y se microinyectó a una concentración de 75ng/µl con rojo fenol en medio danieau (58 mM NaCl, 0.7 mM KCl, 0.4 mM MgSO₄, 0.6 mM Ca(NO₃), 2, 5 mM HEPES, pH 7.6).

2.25.2. Sobreexpresión de LGI1 por ARN.

El vector pSPORT6.1 con el clon *lgi1* se linearizó con *Not* I y a continuación se purificó con el kit de purificación de PCR (Quiagen) antes de proceder a la

transcripción in vitro de ARNm, lo cual se llevó a cabo con el kit *mMessage mMachine* (Ambion) según las indicaciones del fabricante y con la ARN polimerasa SP6. Finalmente, se purificó el ARNm utilizando el kit *mini Quick Spin RNA Columns* (Roche) y se verificó la integridad del ARN en un gel de agarosa 1%.

El ARNm se microinyectó en los embriones a una concentración de 500ng/μl con rojo fenol en medio Danieau.

2.26. Microinyección en huevos de pez cebra.

La microinyección de ADN, ARN o morfolidos se realizó en huevos de uno a dos células sobre placas con agarosa 1,5% (Figura 20) donde previamente se había construido unos canales con ayuda de un molde con la finalidad de que los embriones con el corion queden insertados en dichas ranuras durante la microinyección.

Las agujas de borosilicato se manufacturaron con un *puller*, obteniendo el diámetro adecuado para la microinyección. Esta se realizó con un microinyector manual y una bomba de presión.

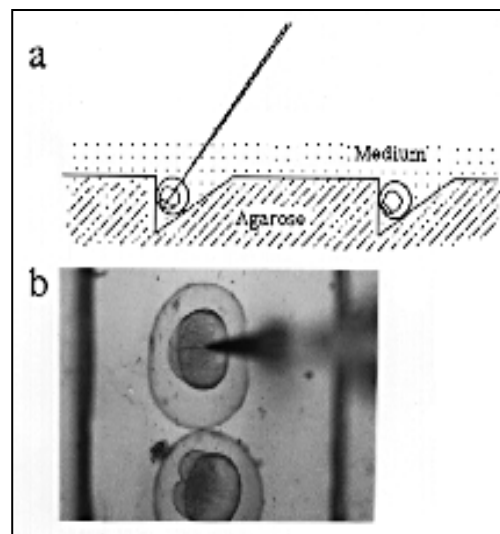


Figura 20: Microinyección de cigotos de *D. rerio*. **a:** vista esquemática de la disposición de los huevos encima del agar y la aguja en la microinyección. **b:** Vista superior de un embrión siendo microinyectado. Las dos líneas negras son las muescas del rail en la agarosa. Tomado de *The Zebrafish Book* (ZFIN).

2.27. Obtención y conservación de los ovocitos de *Xenopus laevis*.

Los ovocitos se aislaron por disección de ranas *Xenopus laevis* adultas las cuales se anestesiaron por inmersión en agua con hielo durante 15-20min. Luego se colocó la rana encima de hielo para la disección y remoción de los ovocitos. Los ovocitos aislados se lavaron en solución libre de Ca^{2+} OR2 (82,5nM NaCl, 2,5nM KCl, 1nM MgCl_2 , 5mM HEPES, pH7,5) antes de tratarlos con 1mg/ml colagenasa filtrada en medio OR2. Una vez eliminada la lámina folicular y seleccionados los ovocitos con buen aspecto bajo la lupa los pasamos a la solución que contiene Ca^{2+} ND96 (96nM NaCl, 2nM KCl, 1,8nM CaCl_2 , 1nM MgCl_2 , 5nM HEPES, pH7,5).

2.28. Transcripción *in vitro* de los canales de potasio y de LGI1.

La transcripción de LGI1 se hizo a partir de la construcción pSRCIII-LGI1 (apartado 2.2.) y con el kit *mMessage mMachine* (Ambion) según las indicaciones del fabricante y con la ARN polimerasa T7 tal como se ha detallado en el apartado 2.25.2.. El ARNm se purificó por el método fenol/cloroformo y tras comprobar su integridad en un gel de agarosa, se conservaron a -20°C . El resto de los genes empleados, los canales de potasio, también clonados en el vector pSRCIII, fueron cedidos por el laboratorio del Dr. Álvaro Villarroel.

2.29. Inyección de ARN en ovocitos de *X. laevis*.

Los ovocitos se inyectaron con 50nl de solución ARN, conteniendo $\sim 10\text{ng}$ de ARN, en una proporción 1:1 en los experimentos de coexpresión. Posteriormente se incubaron los ovocitos a 19°C .

2.30. Registros electrofisiológicos.

A los dos días tras la inyección se registraron las corrientes de célula completa en los ovocitos a temperatura ambiente ($\sim 20^\circ\text{C}$) con la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos (esquematisado en la figura 21) utilizando un amplificador Geneclamp 500B (Axon Instruments). Esta técnica permite fijar el potencial de membrana de una célula y registrar las corrientes iónicas que aparecen al aplicar potenciales hiperpolarizantes y despolarizantes.

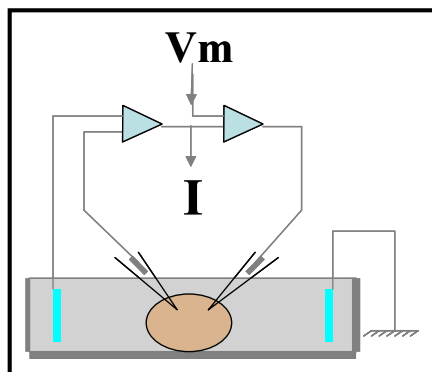


Figura 21: esquema del diseño de la técnica de fijación de voltaje utilizada para registrar las corrientes en los ovocitos. Tenemos tres electrodos, dos en la célula y uno en la solución de baño. Según se aplica el voltaje por uno de los electrodos en la célula, se registra la corriente con el segundo electrodo, previa resta con la corriente registrada en el baño. **V_m** : voltaje de membrana; **I** : corriente.

Los electrodos de borosilicato se llenaron de KCl 3M y las resistencias fueron de $\sim 1\text{M}\Omega$ para ambos electrodos, el de inyección de voltaje y el de registro de corriente. Los ovocitos fueron continuamente perfundidos en medio *Xenopus* salino (100nM NaCl, 2,5nM KCl, 1nM MgCl_2 , 2nM MnCl_2 y 5mM HEPES, pH7,5).

2.31. Protocolos experimentales y análisis de datos.

Los datos se adquirieron con el programa pCLAMP8.1 (Axon Instruments) y la frecuencia de adquisición fue de 1KHz, filtrados a 100Hz. Para generar las relaciones corriente-voltaje se aplicaron pulsos despolarizantes, con incrementos de 10mV, a partir de un potencial basal de -80mV y a una frecuencia de 0,03 Hz.

Objetivos

1. Identificar el gen causante de la ADLTE en una familia de origen vasco ligada a la región 10q24.
2. Estudiar genéticamente 8 familias con Epilepsia Parcial compatible con ADLTE.
3. Determinar la existencia de variabilidad genética en *LGI1* que pueda estar relacionada con la epilepsia parcial.
4. Analizar la función fisiológica de *LGI1* mediante el desarrollo de modelos animales:
 - 4.1. Generar un ratón transgénico que sobreexpresa *LGI1*.
 - 4.2. Desarrollar un ratón transgénico que sobreexpresa la forma de *LGI1* mutada de la familia ADLTE01.
 - 4.3. Caracterizar al menos dos líneas de cada ratón transgénico.
 - 4.4. Estudiar el efecto de la sobreexpresión en *Mus musculus* del transgén *LGI1* en el proteoma del cerebro.
 - 4.5. Estudiar la sensibilidad de los ratones transgénicos a fármacos convulsivos.
 - 4.6. Estudiar el patrón de expresión de *LGI1* en el desarrollo embrionario de *D. rerio*.
 - 4.7. Inhibir la expresión de *LGI1* en el desarrollo embrionario de *D. rerio* y estudiar mediante genes marcadores la integridad estructural del *knockdown*.
 - 4.8. Estudiar el efecto macroscópico que pudiera tener la sobreexpresión de *LGI1* en *D. rerio*.
 - 4.9. Analizar el papel de *LGI1* en la transmisión mediada por canales de potasio dependientes de voltaje en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Resultados

Capítulo I

4.1. Selección de gen candidato en la búsqueda del gen causante de ADLTE.

La región mínima en la cual debía encontrarse el gen causante de ADLTE había sido acotada combinando los estudios de ligamiento de Ottman y Poza a 3cM dentro del brazo largo del cromosoma 10 (10q24). En aquel momento el mapa del Genoma Humano no estaba completo, por lo que el número total de genes dentro de esa región era desconocido. En las bases de datos disponibles se localizaban más de cincuenta genes y nueve patologías en esta región.

Los criterios utilizados para seleccionar los genes candidatos fueron los siguientes:

- 1.- Genes que fueran conocidos previamente y localizados en la región 10q24.
- 2.- Genes expresados en el sistema nervioso central (exclusivamente o no); al menos en la región temporal.
- 3.- Genes codificantes para subunidades de canales iónicos u otras proteínas integrales de membrana relacionadas con la actividad eléctrica.

El análisis de la región reveló que ninguno de los genes conocidos cumplía el criterio de codificar para un canal iónico, por lo que los genes candidatos se seleccionaron en función de su patrón de expresión.

El primer gen seleccionado para la búsqueda de mutaciones fue el gen *LGI1* (Leucine-rich glioma inactivated-1). Este gen había sido descrito en 1998 por Chernova y colaboradores (Chernova *et al.*, 1998) y había sido localizado en 10q24 próximo al marcador D10S185. Los estudios por *Northern blot* revelaban una expresión fundamentalmente restringida al cerebro, dentro del cual se encontró expresión con intensidad variable entre distintas regiones incluyendo el lóbulo temporal.

4.2. Búsqueda de mutaciones en la región codificante de *LGI1* en familias ADLTE.

Cada uno de los 8 exones del gen se analizó por secuenciación directa del producto de PCR comparando las muestras entre los distintos miembros de las

familias de ADLTE, en busca de cambios que fueran compartidos tan sólo por los afectados.

En dos de las familias (ADLTE01 y ADLTE03) se encontraron cambios susceptibles de ser mutaciones, lo cual sugería que *LGI1* podría ser el gen responsable de la patología en, al menos, estas familias.

- Familia ADLTE01

Cambio encontrado: (c.758delC) Deleción de una Citosina en posición 758 (contando desde el codón de inicio de la secuencia AF055636) presente en heterozigosis. (Figura 22a)

Efecto sobre la proteína: Cambia la pauta de lectura a partir del punto de deleción (aminoácido 253) introduciendo una secuencia nueva específica de la forma mutante de 31 aminoácidos que termina en un codón de parada prematuro. La proteína resultante, en caso de expresarse, consistiría en 283 aminoácidos en lugar de los 557 de la forma silvestre. (Figura 22b)

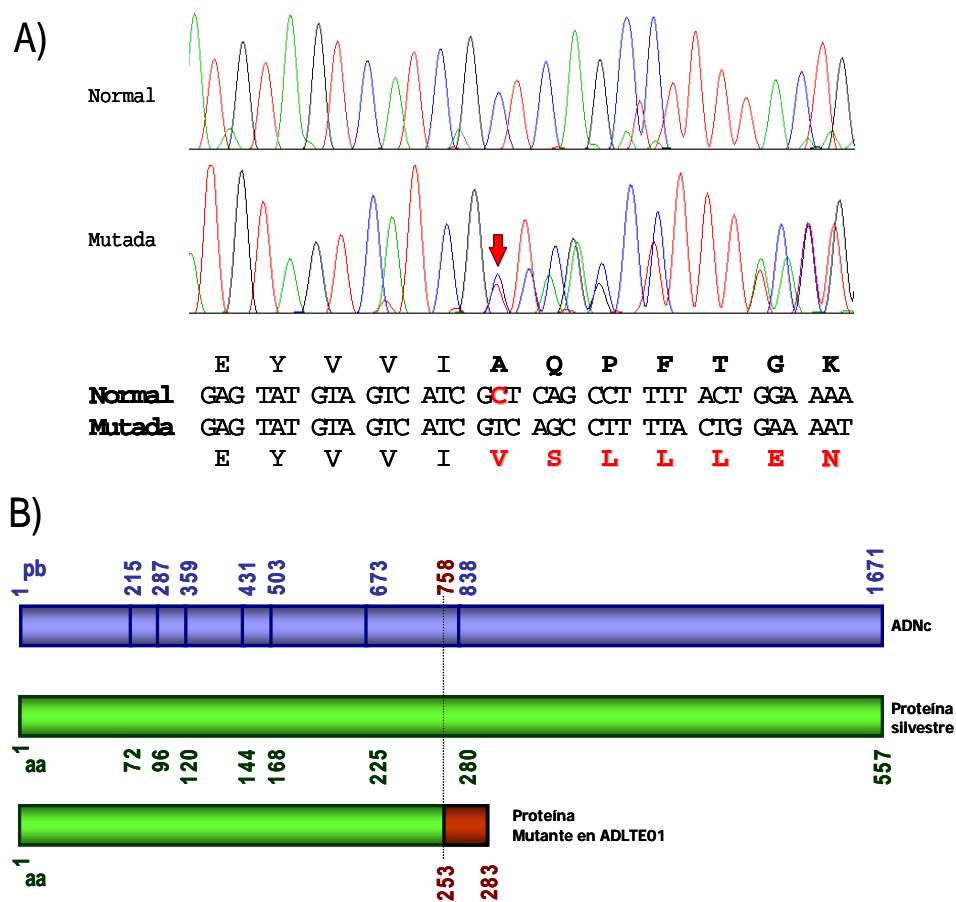


Figura 22: Mutación c.758delC encontrada en la familia ADLTE01.

A: Secuencia nucleotídica donde se indica (flecha roja) la delección de una Citosina en posición 758 y el subsiguiente cambio en la pauta de lectura a partir del punto de delección (aminoácido 253). **B:** Esquema del impacto de la mutación sobre la proteína.

- Familia ADLTE03

Cambio encontrado: (c.1420C>T) Transición Citosina por Timina en la posición 1420 de ADNc, presente en heterozigosis (Figura 23a).

Efecto sobre la proteína: Cambia la arginina en posición 474 por un codón de parada prematuro (p.R474X). La proteína resultante, en caso de expresarse consistiría en 474 aminoácidos (Figura 23b).

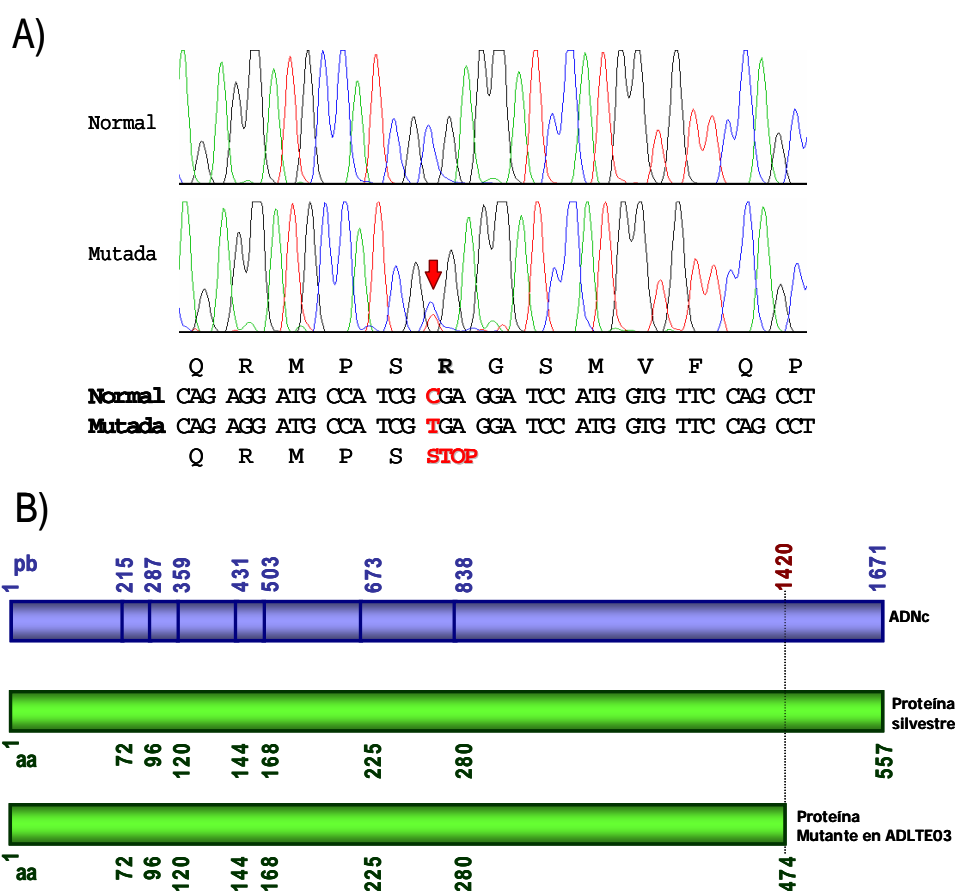


Figura 23: Mutación c.1420C>T encontrada en la familia ADLTE03.

A: Secuencia nucleotídica donde se indica (flecha roja) la transición Citosina por Timina en la posición 1420 y el codón de parada prematuro que genera en la secuencia aminoacídica. Al encontrarse en heterocigosis se observa el solapamiento de las secuencias del alelo normal y el mutado desplazado una posición.

B: Esquema del impacto de la mutación sobre la proteína.

4.3. Segregación de las mutaciones en las familias ADLTE01 y ADLTE03 y estudio poblacional

El análisis de la segregación de la mutación con la enfermedad en las familias se realizó mediante RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

En la familia ADLTE01, la pérdida de la Citosina en posición 758 elimina una diana de restricción para el enzima *Dde* I. La digestión del producto de PCR del exón 7 reveló un patrón de restricción coincidente con la presencia de la delección en heterozigosis (154 y 133 pb el alelo normal y 287 el alelo mutado) compartido por los enfermos de la familia y portadores obligados y no presente en los individuos sanos (Figura 24a).

En la familia ADLTE03, el cambio Citosina por Timina elimina una diana de restricción para el enzima *Nml* I. La digestión del producto de PCR del exón 8 demostró la presencia de la mutación en heterozigosis (618 y 929 pb el alelo normal y 929 el alelo mutante) segregando exclusivamente con los afectados de la familia. (Figura 24b)

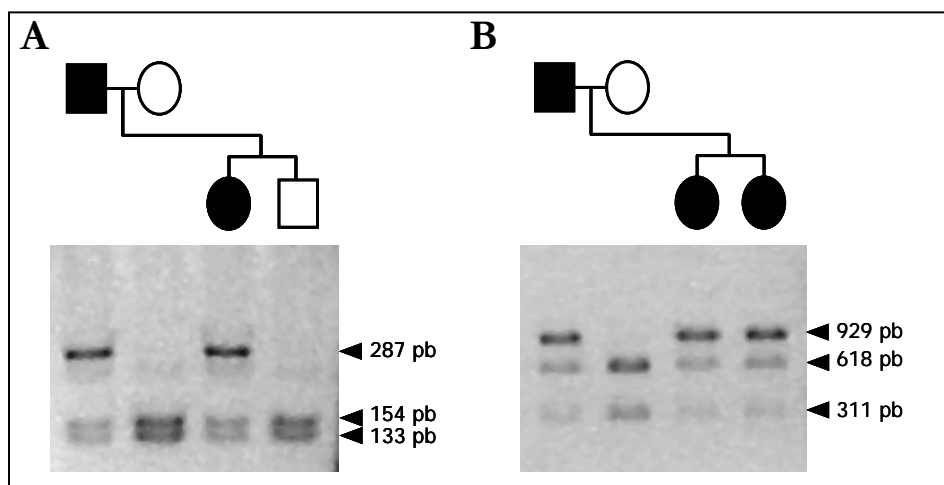


Figura 24: Análisis de segregación de las mutaciones encontradas en *LGI1* con la enfermedad llevado a cabo por un ensayo de RFLP. **A:** En la familia ADLTE01 los alelos mutantes se detectan por la desaparición del sitio *Dde*I que se mantiene intacto en los alelos silvestres. **B:** En la familia ADLTE03 la transición C1320T elimina una diana de restricción para el enzima *Nml* I.

Ninguno de los dos cambios se encontró al realizar el análisis de restricción en 70 individuos sanos (población control del mismo grupo étnico) sugiriendo que estos

cambios realmente corresponden a mutaciones en el gen responsable de la patología y no a simples polimorfismos.

4.4 Análisis de haplotipos de 8 familias con Epilepsia Parcial.

Desde su implicación en la aparición de epilepsia parcial, varias familias han sido descritas con ligamiento a 10q y con mutaciones en *LGI1*. Pero también se han descrito familias ADLTE en las que no se han encontrado mutaciones en *LGI1*, lo cual sugiere la existencia de heterogeneidad genética de este síndrome. Llegados a este punto realizamos el análisis genético de una serie de formas familiares de epilepsia en las que al menos alguno de sus miembros presenta una sintomatología clínica compatible con ADLTE (ADLTE01-08).

Solamente dos de las ocho familias presentaron mutaciones en *LGI1* (ADLTE01 y ADLTE03) (Morante-Redolat *et al.*, 2002), mutaciones ambas descritas en el apartado 2 de este capítulo.

La falta de mutaciones en familias con un fenotipo similar al ADLTE podía deberse a que no fueran detectables mediante la técnica analizada. Por eso, a fin de descartar la implicación del *locus* 10q24 en la aparición de la enfermedad en estas familias analizamos este *locus* en las familias mediante un estudio de haplotipos de marcadores microsatélites. En la figura 25 se muestran los haplotipos de cada miembro de las familias estudiadas según el genotipado de los microsatélites de la región 10q24, D10S185, D10S200, D10S1680, D10S677, D10S520, D10S571, D10S1736, D10S1758 y D10S577.

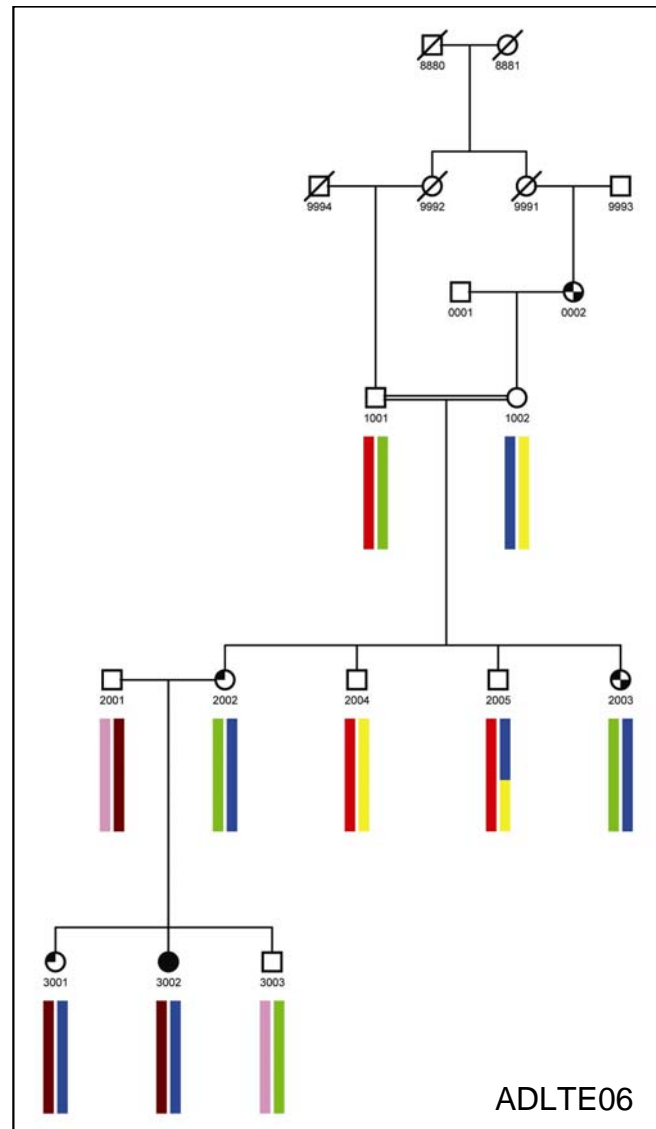
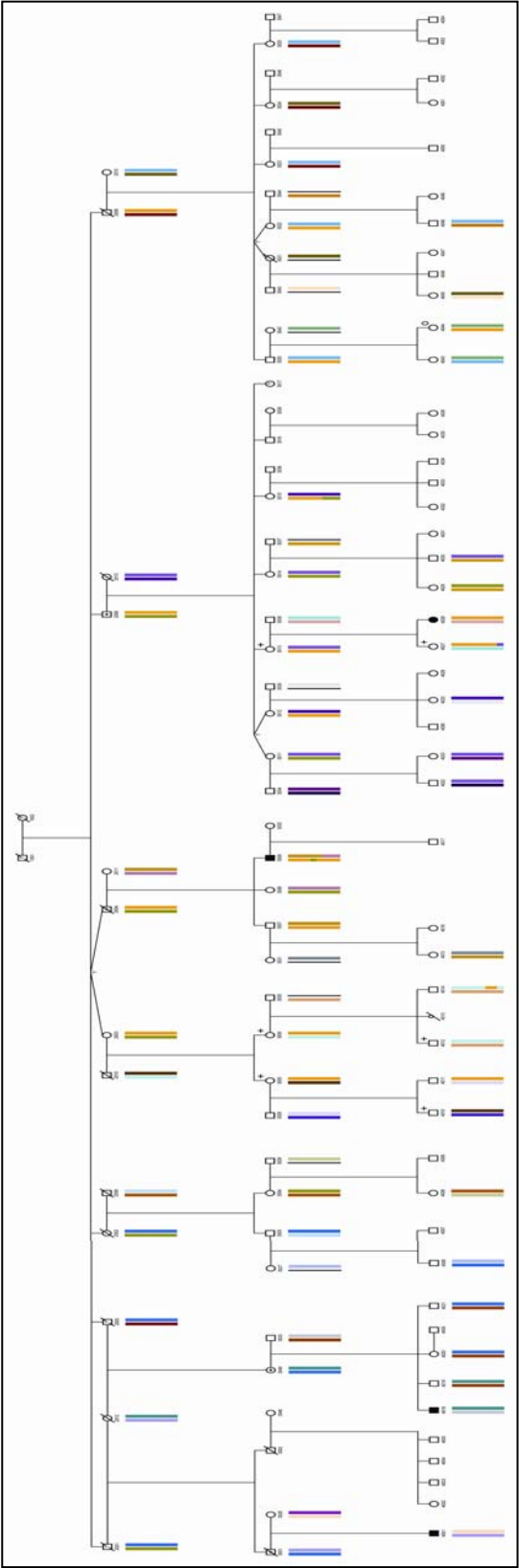
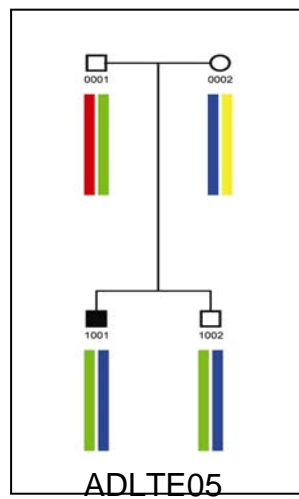
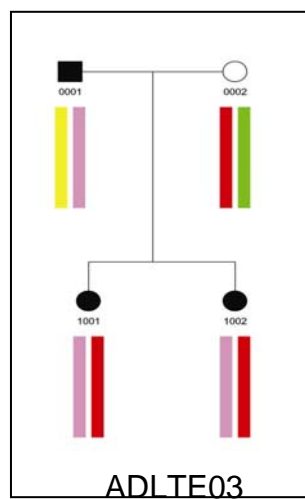
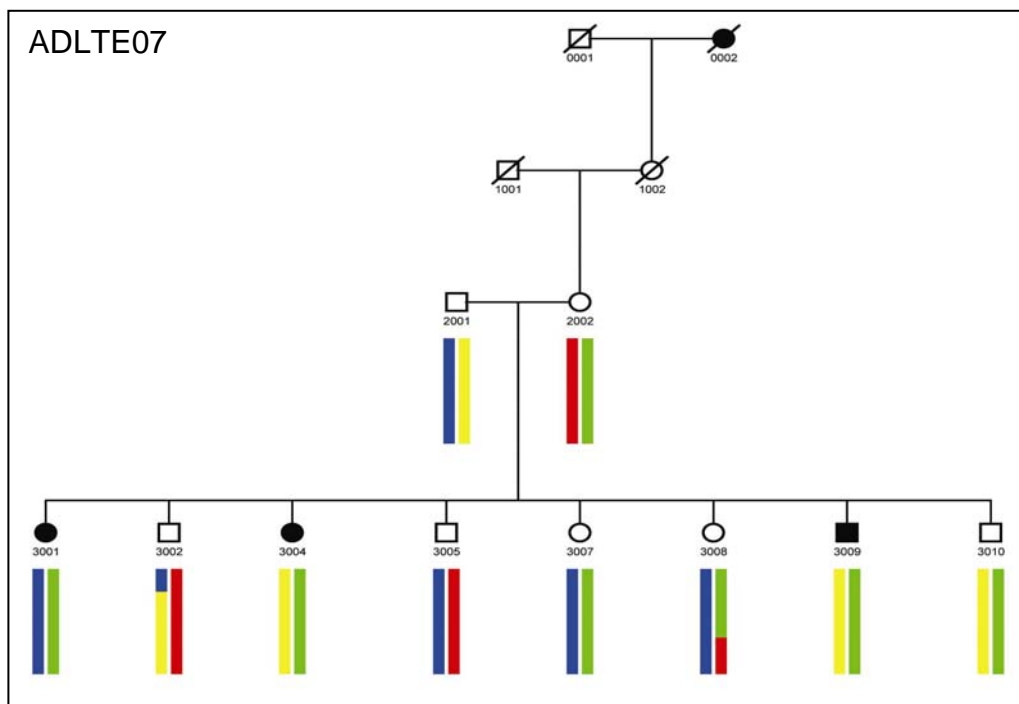


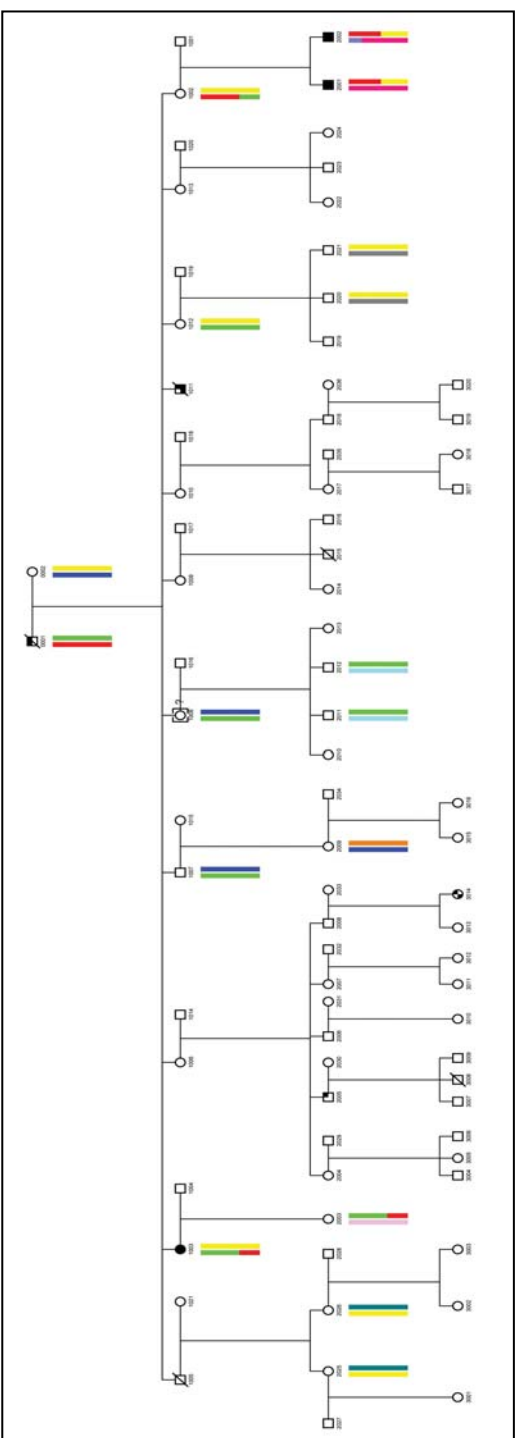
Figura 25: Estructura y haplotipos de las familias con epilepsia parcial analizadas: ADLTE02, 03, 04, 05, 06, 07 y 08. La definición de los símbolos de los árboles genealógicos se muestra en la última página de esta figura. Los haplotipos contruidos según los 9 marcadores analizados alrededor de LGI1 en la región 10q24 se representan con distintos colores para cada haplotipo y con dos colores en el caso de una recombinación. La numeración debajo de cada símbolo hace referencia al código de cada individuo.

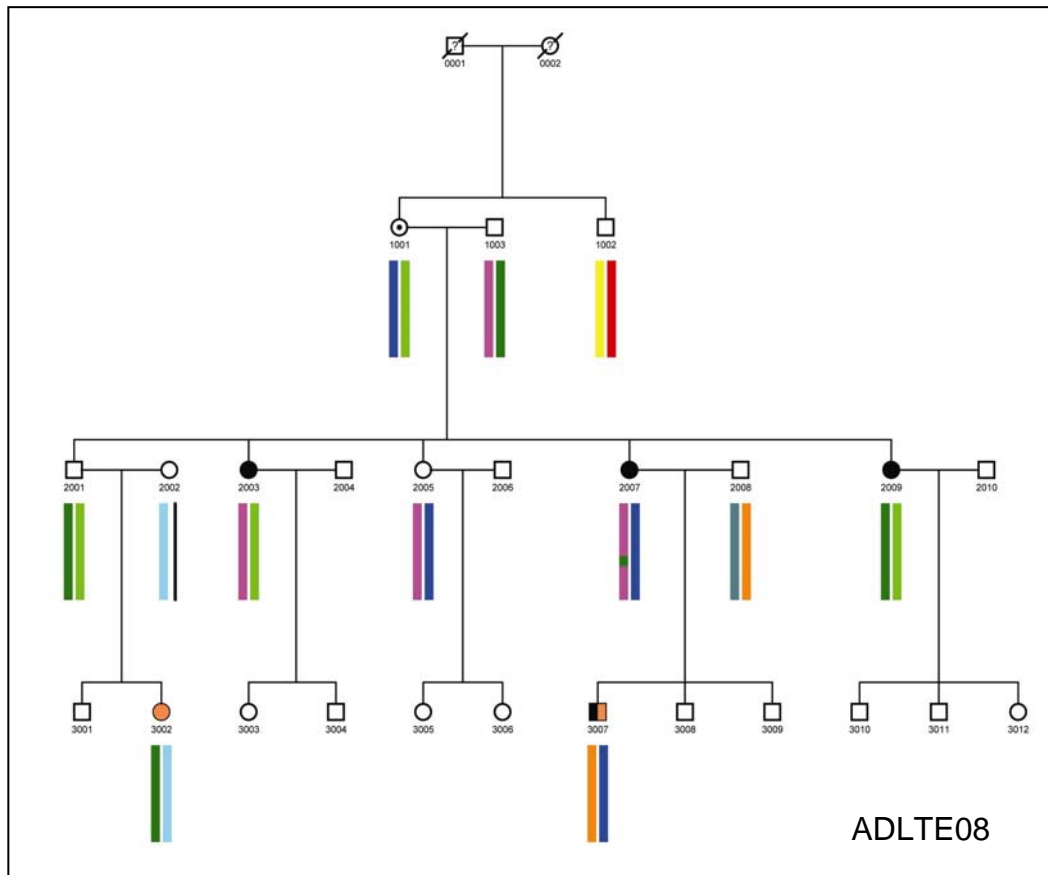
ADLTE02





ADLTE04





Los haplotipos contruidos nos han permitido demostrar en el caso de las familias ADLTE06 y ADLTE07 que los miembros de estas familias comparten un mismo haplotipo en cada familia que segrega con la enfermedad, si bien estos dos haplotipos son distintos entre ellos. La figura 26 muestra la comparación entre los haplotipos detectados en cada una de las familias que presentan segregación del haplotipo con la enfermedad. Curiosamente, las familias ADLTE01 y ADLTE03, sí comparten un mismo haplotipo desde el marcador D10S185 a D10S520, justamente la región en donde se encuentra *LGII*. Sin embargo las mutaciones de ambas familias son distintas, así como su origen étnico (ADLTE01 es de origen vasco mientras que ADLTE03 es una familia andaluza) lo que implica que el haplotipo que contiene la mutación está formado por alelos frecuentes de los marcadores que lo componen.

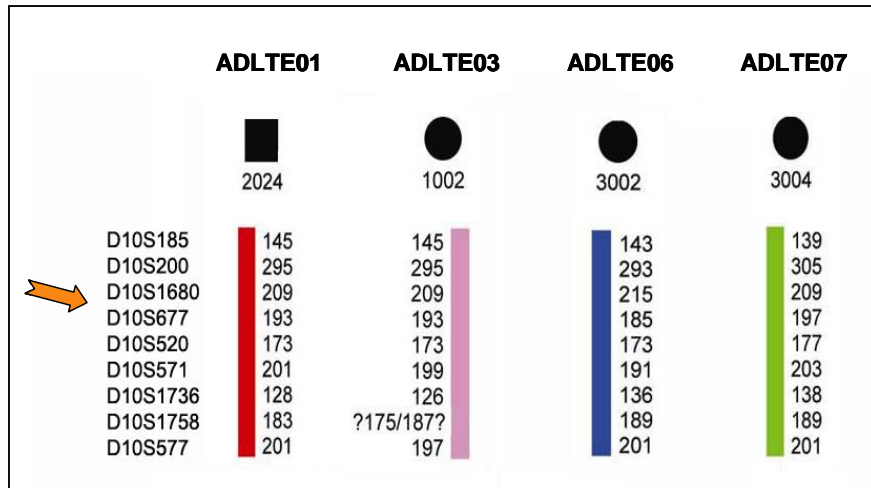


Figura 26: Comparación de haplotipos que segrega con la enfermedad en las familias ADLTE01, 03, 06 y 07. La flecha indica la posición de *LGII* respecto al resto de los marcadores utilizados.

4.5. Análisis de ligamiento a 10q24 de 6 familias con Epilepsia Parcial.

En la tabla 21 aparecen los resultados del estudio de ligamiento frente a la región 10q24 de aquellas familias con una estructura familiar suficiente. La familia ADLTE01, descrita por Poza y colaboradores en 1999 (Poza *et al.*, 1999), es la única de este grupo con un claro ligamiento a la enfermedad ($Z_{\max} = 4,44$ para el marcador D10S571 a $\theta=0,0$) además de presentar una mutación en *LGII*.

Tabla 21. Valores de LOD (Z_{\max}) a la frecuencia de recombinación $\theta=0$ de los marcadores estudiados en las seis familias ADLTE analizadas.

	ADLTE01	ADLTE02	ADLTE04	ADLTE06	ADLTE07	ADLTE08
D10S185	2,15	-0,88	0,08	0,96	-0,02	-3,62
D10S200	0,13	-1,13	-1,97	-0,45	-0,02	-3,86
D10S1680	3,30	-3,54	-0,27	0,85	-0,03	-3,26
D10S677	4,32	-1,39	-0,16	0,96	-0,03	-3,81
D10S520	1,72	-1,43	-0,09	0,79	-0,45	-4,28
D10S571	4,44	-3,43	-0,20	1,15	-0,02	-4,06
D10S1736	1,86	-4,10	-0,15	1,36	-0,64	-0,43
D10S1758	-1,17	-1,04	0,06	0,86	-0,03	-3,67
D10S577	1,43	-1,38	-0,55	-0,09	-0,03	-0,35

La casilla resaltada en gris muestra el valor de LOD más alto en la familia con ligamiento y las casillas resaltadas en rojo muestran los valores de LOD más bajos en las dos familias en las que se excluye ligamiento. En rosa los valores de LOD que cumplen el criterio significativo de ligamiento de exclusión, es decir, menor a -2.

Ninguna de las cinco familias restantes parece estar ligada al *locus* estudiado bajo el modelo de herencia analizado. En las familias ADLTE04, 06 y 07 no se puede excluir ligamiento a la región 10q24 ya que ninguna presenta un valor de LOD suficientemente bajo. Sin embargo, un valor de LOD menor a -2 en las familias ADLTE02 y 08 claramente excluye un ligamiento de la enfermedad presente en estas familias con la región 10q24.

4.6. Estudio de simulación de cuatro familias con Epilepsia Parcial.

Para interpretar mejor los resultados anteriores, se llevó a cabo un estudio de simulación con un modelo similar al utilizado en el estudio de ligamiento. Este análisis también nos permite saber las posibilidades de obtener resultados significativos en el caso de que pretendiéramos llevar a cabo una búsqueda genómica a partir de estas familias. Los resultados del estudio de simulación, en el que no se incluyen las familias ADLTE03 y ADLTE05 por tratarse de familias nucleares, se presentan en la tabla 22. Tampoco se incluyó la familia ADLTE02 por no poseer un patrón de transmisión claro. Ninguna de las familias tiene la potencia estadística suficiente para justificar una búsqueda genómica por separado según el modelo de herencia utilizado, sin embargo, la suma de los valores de LOD medios obtenidos (3,233) sí justificaría dicho análisis.

Tabla 22: Estudio de simulación en las familias ADLTE04, 06, 07 y 08.

	Ligado		No ligado	
	LOD $\theta=0.05$	p(LOD>0,5)	LOD $\theta=0.05$	p(LOD>0,5)
ADLTE04	1,161	0,637	-1,071	0,073
ADLTE06	0,47	0,364	-0,465	0,024
ADLTE07	1,041	0,728	-1,107	0,068
ADLTE08	561	0,48	-0,573	0,072
TOTAL	3,233			

4.7. Búsqueda de polimorfismos en *LGI1*.

Rastreamos por secuenciación la región codificante de *LGI1* en 40 muestras controles en busca de polimorfismos. No encontramos ninguna variación en la secuencia del producto de PCR de los 8 exones de *LGI1*.

En estas mismas 40 muestras se secuenció parte de la región promotora de *LGI1*, concretamente 1200pb desde el codón ATG de inicio de transcripción. Tampoco en esta región se encontró ningún polimorfismo.

Resultados

Capítulo II

Mus musculus

En función de los resultados hasta ahora descritos, *LGI1* se expresa mayoritariamente en el sistema nervioso central (Chernova *et al.*, 1998), tanto en humanos como en el ratón. Con el fin de determinar qué efectos tiene la sobreexpresión de *LGI1* en el ratón, nos dispusimos a generar dos ratones transgénicos que presentan el gen humano *LGI1* bajo el promotor específico del sistema nervioso central Thy-1.2.

4.8. Transgénico de sobreexpresión: *LGI1* silvestre.

4.8.1. Obtención de la construcción génica Thy-LGI1- wt.

La secuencia *LGI1*- wt (ADNc de la secuencia silvestre de *LGI1* humano) se clonó por PCR en el vector pTSC21K que contiene el promotor Thy-1.2 específico del sistema nervioso central. Esta construcción se denomina Thy-LGI1- wt. Para obtener el fragmento de microinyección con el transgén y todas las estructuras necesarias para la correcta expresión del transgén, como son las secuencias de polyadenilación y secuencias intrónicas del gen Thy, se digirió la construcción con *NotI* liberando el fragmento linearizado de 2,4 Kb que contiene *LGI1* y el vector de 7,6 Kb (Figura 27).

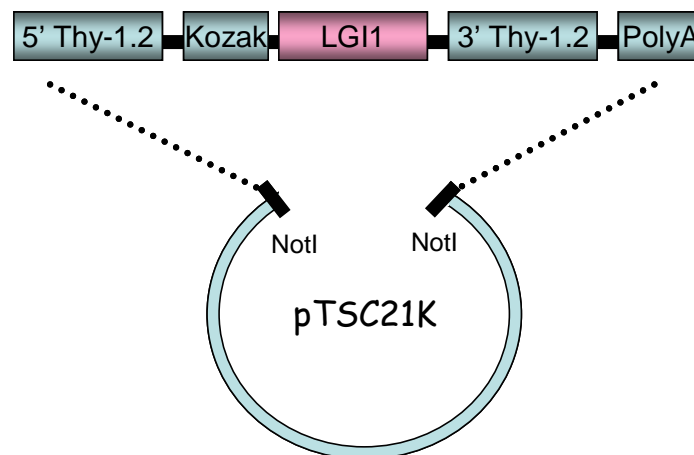


Figura 27: Representación esquemática de las estructuras que forman la construcción plasmídica pTSC21K-LGI1-wt. **NotI:** dianas de restricción de la enzima *Not I* utilizadas para linearizar el trasgén formado por (en dirección 5'3'): secuencia 5' del promotor Thy1.2; secuencia reguladora Kozak; ADNc humano de *LGI1*; secuencia 3' del promotor Thy1.2; cola poly A estabilizadora del ARNm.

4.8.2. Generación de los ratones transgénicos Thy-LGI1- wt.

La construcción anteriormente mencionada fue inyectada en ovocitos fertilizados B6D2F1 para la generación de los animales transgénicos. De 19 hembras reimplantadas (ensayos llevados a cabo en dos laboratorios distintos) se obtuvieron un total de 49 crías que fueron genotipadas por PCR a partir de ADN extraído de la cola. El ensayo de PCR se diseñó para amplificar, únicamente, el transgén. Ninguna de las muestras analizadas de esta forma dio un resultado positivo, no habiendo podido conseguir por lo tanto ningún ratón transgénico a partir de la construcción Thy-LGI1-wt.

4.8.3. Letalidad en los ratones Thy-LGI1- wt. Análisis de embriones portadores del transgén.

Dado que no se había conseguido ningún ratón transgénico Thy-LGI1- wt se pensó en la posibilidad de que la sobreexpresión de *LGI1* fuese letal. Para comprobar esta hipótesis determinamos en primer lugar el momento del desarrollo embrionario en el que se activa la sobreexpresión del transgén. Un análisis bibliográfico preliminar ofrece información contradictoria sobre la activación durante el desarrollo embrionario del promotor Thy1.2. Mientras la mayor parte de los trabajos hacen referencia a la actividad del promotor de manera exclusiva en la vida adulta, unos pocos si parecen indicar que existe un cierto nivel de expresión dirigida por Thy1.2 durante el desarrollo ((Kollias *et al.*, 1987; Kahle *et al.*, 2001; Campsall *et al.*, 2002). Así pues, analizamos embriones de 11, 12, 14, 15 y 17 días y ratones P0. Todas las crías fueron genotipadas y analizadas por RT-PCR a tiempo real. En la tabla 23 se puede observar cómo desde el primer día de desarrollo analizado el promotor está activado y el transgén se sobreexpresa.

Tabla 23: Determinación de la expresión del transgén en los embriones transgénicos.

Edad Embrión	ARN transgén
E11	4,29±0,40
E12	2,35±0,24
E14	1,88±0,03

Tabla 23 (Continuación): Determinación de la expresión del transgén en los embriones transgénicos.

E15	3,81±0,25
E17	0,51±0,04
P0	11,16±0,40
E11	4,29± 0,39

La cuantificación del transgén, relativa a la expresión de LGI1 endógeno en embriones no transgénicos de la misma edad, es dada como media de dos o más reacciones junto con la desviación estándar.

Con la intención de acotar más el tiempo de activación del promotor Thy1.2 analizamos los días 9, 17 y 19 del desarrollo embrionario, esta vez utilizando una línea de ratón transgénico diferente que sobreexpresa la proteína GFP dirigida también por el promotor Thy1.2. En la Figura 28 se puede ver el resultado de la RT-PCR y posterior amplificación de parte de GFP, obteniendo una banda de 100pb en los transgénicos que transcriben GFP (E17 y E19) y ninguna en los transgénicos de desarrollo temprano como E9.

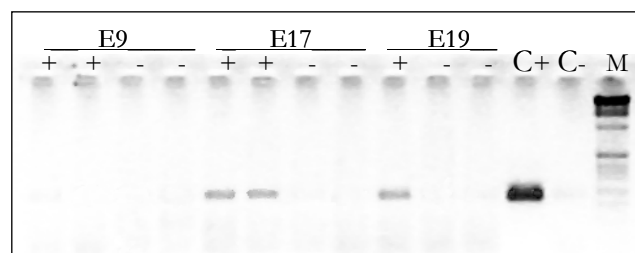


Figura 28: RT-PCR del transgén GFP en embriones transgénicos (+) y no transgénicos (-) para este gen. La proteína GFP se expresa en los estadios E17 y E19, pero no en E9. **C+:** control positivo para la PCR; **C-:** blanco de la PCR (agua); **M:** marcador de peso molecular de 1Kb.

Con esta información, nos propusimos volver a microinyectar la construcción Thy-LGI1-wt y tras reimplantar los ovocitos, interrumpir el embarazo en el estadio

E9. Genotipamos todos los embriones y los analizamos a la lupa en busca de malformaciones o anomalías morfológicas macroscópicas. De doce embriones analizados, cinco resultaron estar vivos y sanos. El resto de los embriones no se habían desarrollado y se encontraban en proceso de reabsorción. Ninguno de los doce resultó ser portador del transgén microinyectado.

4.9. Transgénico de sobreexpresión: mutación 01 de *LGI1*.

4.9.1. Obtención de la construcción génica Thy-LGI1-01.

Se clonó por PCR la secuencia LGI1- 01 (secuencia ADNc de la forma truncada de LGI1 generada por la mutación c.758delC descrita en la familia ADLTE01 (ver Resultados Capítulo I)) en el vector pTSC21K (Figura 29) que contiene el promotor Thy-1.2 específico del sistema nervioso central. Esta construcción se denomina Thy-LGI1- 01. Al igual que para la preparación del transgén Thy-LGI1-wt para obtener el fragmento de microinyección se digirió la construcción con *Not* I liberando el fragmento a microinyectar.



Figura 29: Digestión de la construcción plasmídica pTSC21K-LGI1-01 con *Not* I para la obtención del fragmento de microinyección en ratones. La banda superior de 7600pb es la purificada y microinyectada, mientras que la banda de 2400 pb que contiene la resistencia a antibiótico, se descarta.

4.9.2. Generación de los ratones transgénicos Thy-LGI1-01

La construcción anteriormente mencionada fue inyectada en ovocitos fertilizados B6D2F1 para la generación de los animales transgénicos. De 4 hembras reimplantadas se obtuvieron 17 crías las cuales se analizaron mediante PCR, detectándose dos fundadores.

Los ratones transgénicos fueron seguidamente cruzados con ratones silvestres B6D2F1 y se analizó la progenie mediante PCR para determinar si el transgén se había integrado en la línea germinal. Todos los ratones fundadores transmitieron el transgén a su descendencia (Figura30).

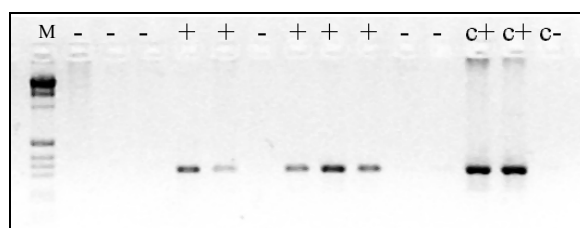


FIGURA 30: Genotipaje de ratones por PCR. Los cebadores empleados son específicos del transgén LGI1. **C+:** control positivo para la PCR (el mismo transgén purificado); **C-:** control negativo para la PCR (agua). **(-):** resultado negativo o no transgénico; **(+):** resultado positivo o transgénico.

4.9.3. Establecimiento de dos líneas y determinación del número de copias de transgén incorporados.

El número de copias de transgén insertados en el genoma de los ratones se analizó mediante PCR a tiempo real, utilizando como gen control o *housekeeping gene* el gen de la Actina, y la sonda contra el transgén, específica del promotor Thy de la construcción microinyectada.

Al analizar las dos primeras generaciones de ratones se observó que el número de copias insertadas variaba en cada generación y también entre hermanos (Tabla 24). Por ello fue necesario volver a cruzar los ratones (95c y 96c) para poder estabilizar el número de copias de transgén y así establecer dos líneas de ratones transgénicos, una con aproximadamente 75 copias ($74,15 \pm 8,89$) y otra línea con aproximadamente 15 copias ($17,49 \pm 2,25$) (Tabla 25).

Tabla 24: Cuantificación relativa del n° de copias de transgén incorporado en los ratones transgénicos antes de estabilizar las líneas. El número de copias está dado en media \pm Desviación Estándar.

Fundador	Generación	RATÓN	Promedio N° de copias
A	1	15	28,13 \pm 5.63
A	1	20	29,45 \pm 6.72
A	1	76	43,22 \pm 14.59
A	2	46c	68,74 \pm 10.45
A	2	47c	57,42 \pm 16.96
A	2	56c	34,58 \pm 12.33
A	2	93c	32,88 \pm 3.46
B	1	47	15,55 \pm 0.65
B	1	49	62,16 \pm 5.19
B	2	95c	64,43 \pm 8.65
B	2	96c	14,82 \pm 2.43

Tabla 25: Cuantificación relativa del n° de copias de transgén incorporado en los ratones transgénicos después de estabilizar dos líneas.

Ratón	N° Copias	Promedio	Línea
96c	14,82	17,49	L15
81d	18,42		
93d	15,51		
22e	16,32		
26e	20,02		
29e	19,84		
95c	64,43	74,15	L75
6e	68,51		
16e	75,24		
32e	69,47		
38e	77,89		
43e	89,37		

4.9.4. Análisis de la transcripción del transgén LGI1-01.

Estudiamos en primer lugar los niveles de expresión del transgén en las dos líneas de ratones transgénicos generadas. Por falta de un anticuerpo adecuado para la detección por *Western blot* del transgén, restringimos el estudio de la expresión del transgén al nivel de transcripción. Para ello se extrajo el ARNm de cerebro de los ratones y tras comprobar la igualdad de eficiencia entre las dos sondas TaqMan utilizadas (ver el apartado de Materiales y Métodos), se llevó a cabo una RT-PCR a tiempo real que nos permitió cuantificar la cantidad relativa de ARNm del transgén transcrito en los ratones transgénicos. Como se muestra en la Figura 31, la expresión del transgén es mayor en la línea con mayor número de copias, la línea 75.

Además del cerebro y aunque el promotor Thy es específico del SNC, quisimos también estudiar otros tejidos, el hígado y el músculo esquelético, donde se ha descrito expresión, aunque leve, de *LGI1*. La expresión del transgén en estos tejidos es casi nula.

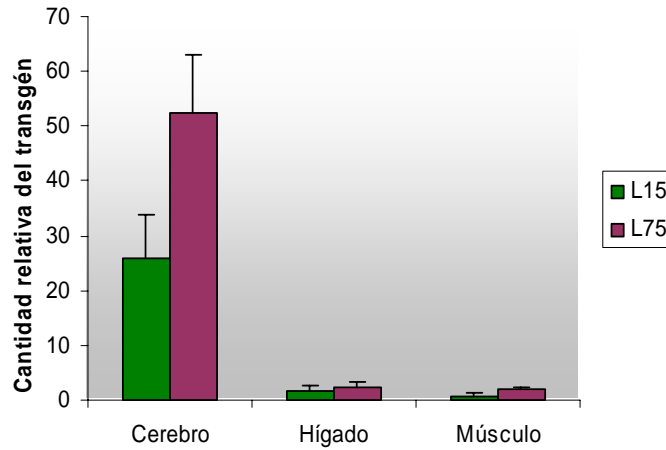


FIGURA 31: Cuantificación relativa de la expresión del transgén Thy-LGI1-01 en Cerebro, hígado y músculo esquelético en ambas líneas de ratones transgénicos, línea 15 (L15) y línea 75 (L75).

4.9.5. Análisis del comportamiento de los transgénicos Thy-LGI1-01.

Los ratones transgénicos 01 generados presentan un fenotipo macroscópico totalmente normal. La tasa de nacimiento también es normal, así como la longevidad.

Con el objetivo de confirmar que la sobreexpresión del transgén no afecta a las funciones básicas del SNC, sometimos a tres grupos de ratones a una batería de pruebas estandarizadas de comportamiento, cognitivas y motoras (ver apartado de Materiales y Métodos). Los grupos empleados fueron ratones controles o no transgénicos, línea 15 y línea 75.

4.9.5.1. Peso.

Se midió el peso de los animales antes y después de realizar la batería de pruebas. En la tabla 26 se muestran las medidas obtenidas para cada grupo dadas en media +/- DS (desviación estándar).

Tabla 26: Peso de los ratones en el inicio y en el final del total de las pruebas.

	Inicio		Final	
	Media	DE	Media	DE
Wt	24,8	3,8	24,8	2,9
L75	26,3	4	25,8	2,7
L15	25,5	4,9	25,6	4

Medias dadas en gramos. **DE:**

Desviación estándar de las medias.

wt: wildtype o ratón control.; **L15:**

línea 15; **L75:** línea 75.

4.9.5.2. Campo abierto.

En esta caja donde el animal puede moverse libremente durante un tiempo estipulado (10 minutos en nuestro caso), se analiza la actividad exploratoria espontánea del animal.

En la figura 32a-c se muestran los resultados para cada parámetro analizado. No se observan diferencias entre grupos en la distancia recorrida, ni en el tiempo transcurrido en reposo. Si se establecen unos límites entre la zona periférica o de la pared de la caja y la zona interna, se aprecia una tendencia de la línea 75 a recorrer una distancia menor en la zona periférica (figura 32b). Sin embargo, esta diferencia no llega a ser estadísticamente significativa. Al medir el tiempo permanecido en las paredes la línea 75 muestra una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) (figura 32d), aunque con una elevada variabilidad interindividual.

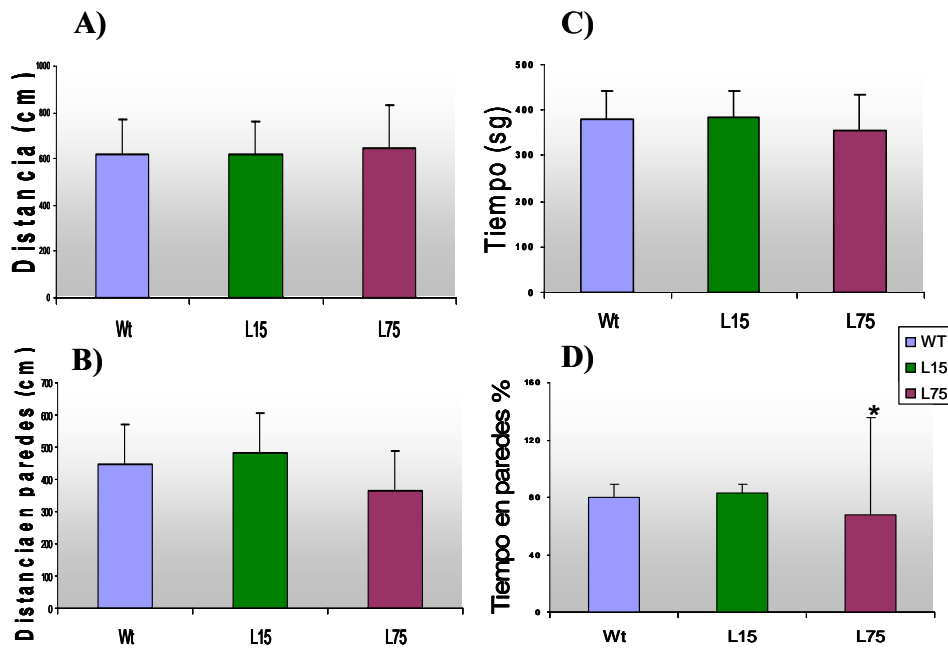


FIGURA 32: Resultados de las pruebas en el campo abierto. **A:** Distancia total recorrida por cada grupo de ratón durante los 10'. **B:** Distancia (cm) recorrida en la periferia o paredes del campo. **C:** Tiempo transcurrido en reposo durante los 10'. **D:** Tiempo transcurrido en las paredes para cada grupo. Una diferencia significativa de $p < 0,05$ se expresa con un asterisco *

4.9.5.3. Laberinto elevado.

El laberinto elevado es una cruz con dos brazos abiertos y otros dos cerrados, todo ello a medio metro de altura del suelo y se emplea para analizar la ansiedad de los animales.

Se ha medido la distancia y el tiempo permanecido en cada tipo de brazo (figura 33) observándose una clara preferencia por los brazos cerrados como era de esperar en ejemplares no afectados. Sin embargo, los ratones de la línea 75 transcurren menos tiempo que los controles en los brazos cerrados ($P < 0,05$). Esta tendencia de la línea 75 se ve confirmada (Figura 33c) por el mayor número de entradas en los brazos abiertos de la línea 75.

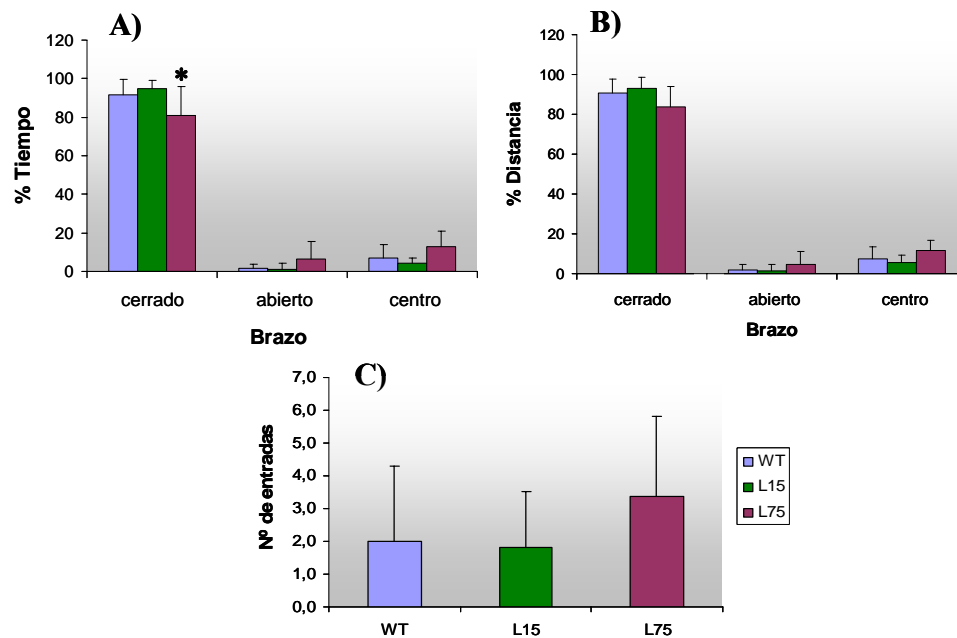


FIGURA 33: Representación de los resultados de la prueba del laberinto elevado. **A:** Tiempo dado en porcentaje en cada una de las zonas, brazos abiertos, brazos cerrados y el centro de la cruz. **B:** Distancia recorrida en cada una de las zonas, también dada en porcentaje. **C:** Número de entradas que realizan los ratones en los brazos abiertos del laberinto elevado. Una diferencia significativa de $p < 0,05$ se expresa con un asterisco *.

4.9.5.4. Fuerza de agarre.

Con esta prueba hemos medido la fuerza realizada por las extremidades anteriores de los ratones. En la figura 34 se puede observar que no hay diferencias significativas entre los tres grupos analizados.

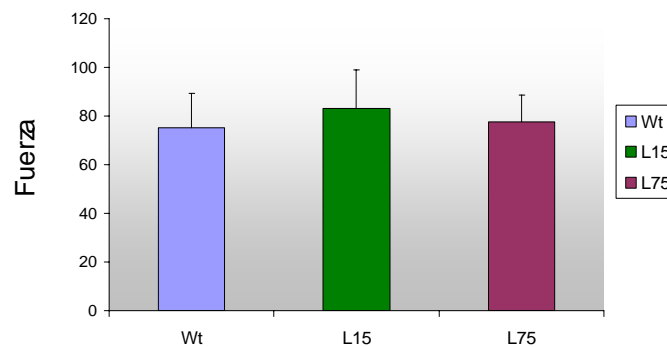


FIGURA 34: Resultados de la Fuerza de agarre de los miembros anteriores de los ratones para cada grupo. Los datos están dados en gramos.

4.9.5.5. Rota-Rod.

Esta es una prueba de capacidad motora en la que se analiza la habilidad del ratón para mantenerse en equilibrio encima de una rueda giratoria así como su resistencia. En el primer día, a los ratones se les enseña a caminar encima de la rueda giratoria a una velocidad mínima fija. En el segundo día se incrementa la velocidad de la rueda progresivamente en cada ensayo. En la Figura 35a se puede observar una tendencia de la línea 75 a caerse de la rueda antes que el grupo control. En un segundo protocolo se aumenta la velocidad progresivamente de 4 a 40 rpm durante dos minutos. En la Figura 35b se puede ver como los tres grupos tienen un tiempo de resistencia parecido.

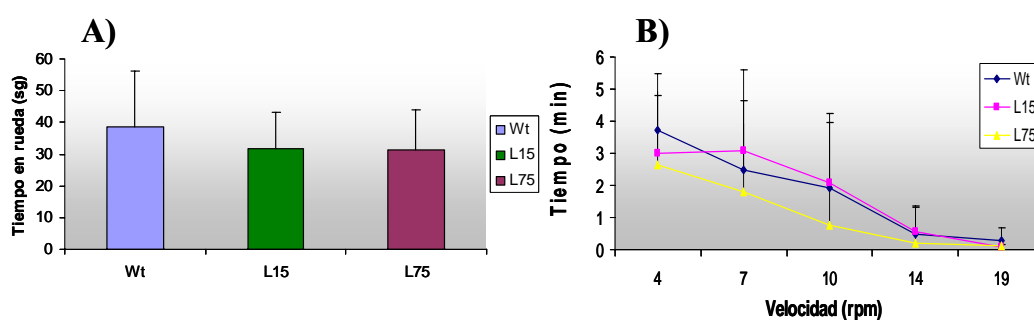


FIGURA 35: Resultados de la prueba de Rota-Rod. **A:** Tiempo (sg) de permanencia en la rueda giratoria a 4rpm constante, para cada grupo de ratones. **B:** Representación de los datos obtenidos en distintas pruebas con velocidades de la rueda cada vez mayores. En el eje X la velocidad en rpm y en el eje Y el tiempo (min) que aguantan los ratones sin caerse de la rueda.

4.9.5.6. Test de Morris.

Con el objetivo de analizar la capacidad de aprendizaje y memoria de los ratones, llevamos a cabo esta prueba que consta de dos partes: la visible, donde se ve la plataforma y la invisible o espacial, donde el ratón no ve la plataforma, pero donde existen unas pistas o claves exteriores que ayudarán al ratón a orientarse para alcanzar la plataforma.

En la figura 36a-b se aprecia, por la disminución del tiempo y recorrido, cómo los ratones han aprendido a encontrar la plataforma flotante en el test visible. Se analizó también el recorrido y tiempo transcurrido cerca de las paredes en contraposición a la zona interior y si bien no hay una diferencia significativa entre grupos, podríamos hablar de una tendencia de la línea 75 a rehuir la zona periférica (figura 36c-d).

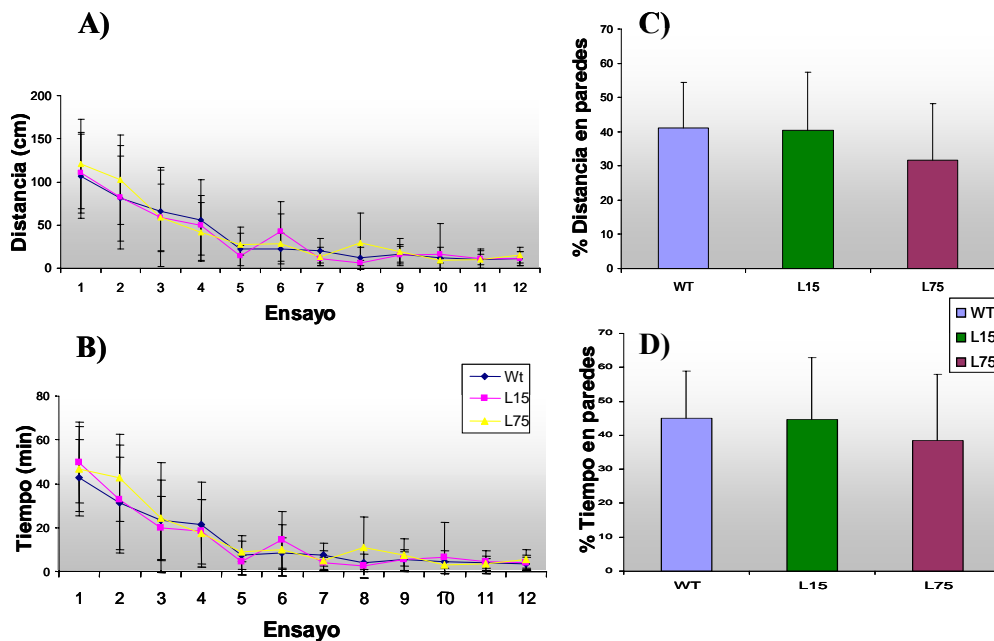


FIGURA 36: Resultados de la prueba de Morris visible. **A:** Distancia (cm) recorrida por cada grupo en cada uno de los doce ensayos realizados. **B:** Tiempo (min) empleado en llegar a la plataforma visible en cada uno de los doce ensayos realizados. **C:** Distancia (cm) recorrida cerca de las paredes, dada en tanto por ciento respecto al total de la distancia recorrida en la prueba completa. **D:** Tiempo (min) transcurrido cerca de las paredes, dada en tanto por ciento respecto al total del tiempo transcurrido en la prueba completa.

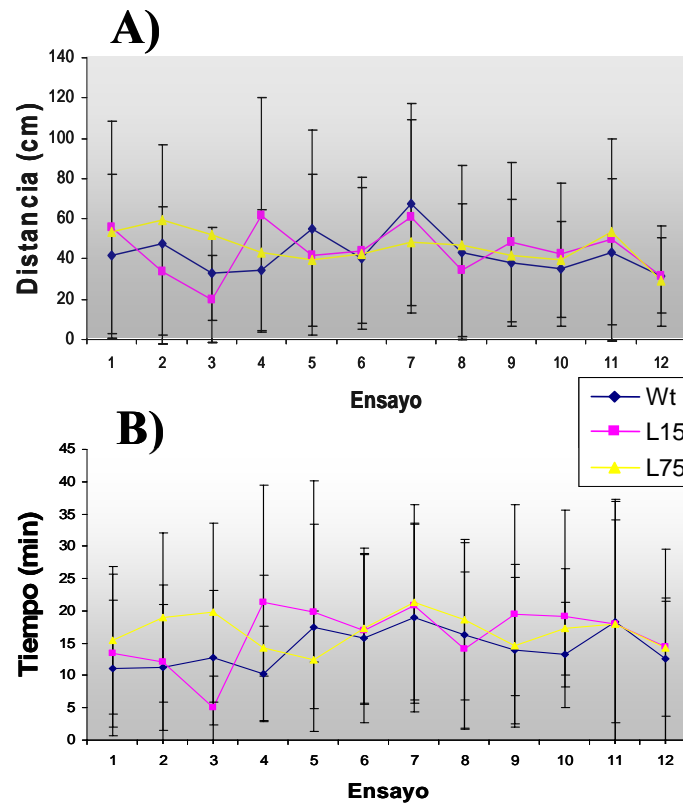


FIGURA 37: Resultados de la prueba de Morris espacial. **A:** Distancia (cm) recorrida por cada grupo en cada uno de los doce ensayos realizados. **B:** Tiempo (min) empleado en llegar a la plataforma invisible en cada uno de los doce ensayos realizados.

Mientras que los ratones han sido capaces de aprender el test de Morris visible, la figura 37 indica que ninguno de los grupos mejora con los sucesivos ensayos en el test espacial.

El último ensayo con la piscina de Morris, el llamado *probe*, fue en cierta forma contradictorio. Se trata de retirar la plataforma flotante de la piscina manteniendo las claves externas y medir el tiempo transcurrido en cada zona de la piscina incluyendo la región que fuera plataforma, esperándose una preferencia del ratón por el cuadrante de la plataforma. Se llevó a cabo un *probe* tras el último test espacial y un segundo *probe* al día siguiente. Tal como se puede apreciar en la figura 38, los resultados de ambas pruebas son distintos, tanto cuando se mide el tiempo transcurrido en el cuadrante

diana como cuando se mide el número veces en la que es cruzada la diana (zona que fue plataforma). En el *probe 1* se observa una tendencia de la línea 75 a frecuentar menos la diana.

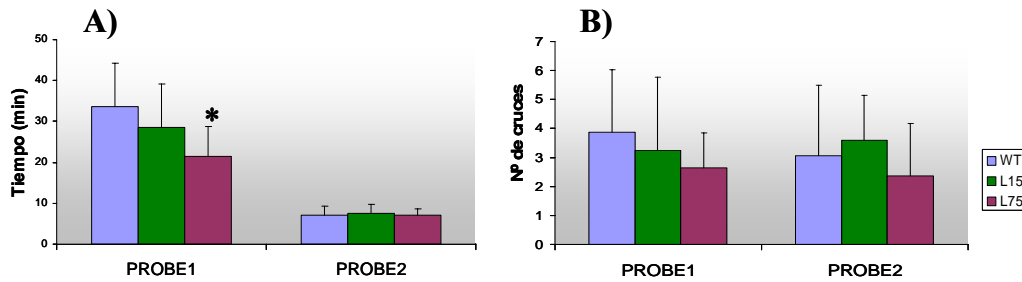


FIGURA 38: *Probes 1 y 2* del test de Morris. En esta última prueba del test de Morris se ha retirado la plataforma. El *probe1* se realiza al término de la prueba espacia y el *probe2* al día siguiente. **A:** Tiempo (min) transcurrido en alcanzar la zona previamente ocupada con la plataforma. **B:** N° de cruces realizados por la zona diana durante el minuto que dura la prueba. Una diferencia significativa de $p < 0,05$ se expresa con un asterisco *.

4.9.6. Análisis del efecto de la sobreexpresión de *LGI1* en otras proteínas.

4.9.6.1. Análisis de la expresión de proteínas concretas por RT-PCR a tiempo real en los ratones Thy-*LGI1*-01.

Durante la realización de este trabajo, en el laboratorio se ha ido confirmando la hipótesis de la implicación de *LGI1* en la inhibición del crecimiento neuronal mediada por la mielina. Entre otras proteínas en este proceso se halla directamente implicado el complejo formado por el receptor $p75^{\text{NTR}}$, el receptor de Nogo y Lingo1. Con el objetivo de analizar la posible relación de *LGI1* con estas tres proteínas, nos propusimos estudiar la expresión de estos tres genes en los ratones de sobreexpresión de *LGI1*.

A tal efecto, utilizamos la técnica de RT-PCR a tiempo real con sondas específicas para cada gen y reacciones de PCR de eficiencia equiparable (diferencia entre las pendientes $< 0,1$). Como se puede observar en la figura 39, no hay diferencia en la expresión entre el grupo control (ratones wt) y la línea 75 que sobreexpresa *LGI1*-01.

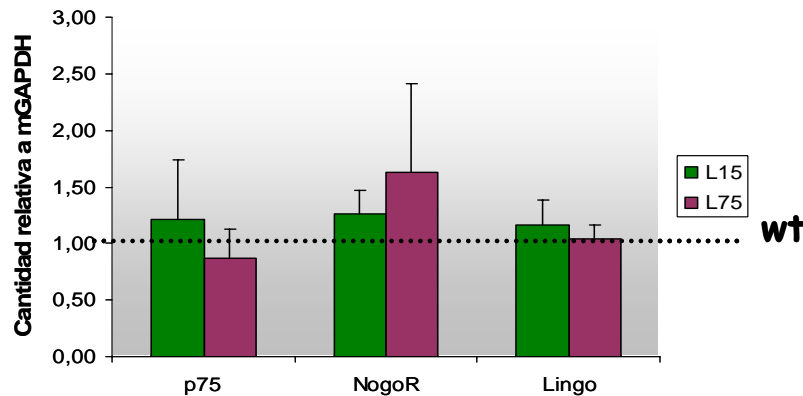


Figura 39: Cuantificación relativa del ARNm de p75^{NTR}, NogoR y Lingo en cerebro de ratones transgénicos de ambas líneas. Es este ensayo de RT-PCR a tiempo real la cuantificación se realizó relativa a la expresión del gen control GAPDH y de la expresión de estos genes en los ratones no transgénicos (wt), en los que esta expresión se consideró 1 (línea horizontal punteada).

4.9.6.2. Análisis de proteínas totales de cerebro en los ratones Thy-LGI1-01.

Con el objetivo de identificar productos proteicos potenciales que pudieran estar regulados por un posible efecto de la sobreexpresión del transgén LGI1-01, llevamos a cabo un ensayo de electroforesis bidimensional a partir de tejido de cerebro de ratón. Se realizaron dos análisis independientes, uno con el grupo de ratones silvestres frente a la línea 75 y el otro con los ratones silvestres frente a los de la línea 15. Para cada grupo se utilizaron 6 muestras por lo que cada análisis se llevó a cabo con 12 geles, los cuales fueron teñidos con Coomassie y escaneados para obtener imágenes en formato *tiff* y poderlos analizar con el programa informático PDQuest.

El análisis de los geles dio como resultado la detección de una media de 200 puntos de los que 150 se encontraron presentes en todos los geles examinados. A su vez. De éstos se descartaron aquellos puntos con una calidad baja (menor al 75%) según el programa.

La cuantificación de la intensidad del marcaje de cada punto proteico de los geles bidimensionales, definida como la intensidad relativa a la intensidad total de los puntos válidos en el gel, reveló que la gran mayoría de los puntos detectados en las muestras de cerebro son cuantitativamente similares independientemente de si

representan muestras con una sobreexpresión del transgén LGI1-01 o muestras de ratones silvestres. En la figura 40 se muestra la cuantificación de la totalidad de los puntos analizados, indicando con un asterisco los puntos significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre la línea transgénica y los animales control, ocho para el análisis de la línea 15 y seis para el análisis de la línea 75.

Todos los puntos con diferencias respecto al grupo control se muestran en la figura 41. Únicamente uno de los puntos es significativamente diferente en ambas líneas de ratones transgénicos frente a la línea control.

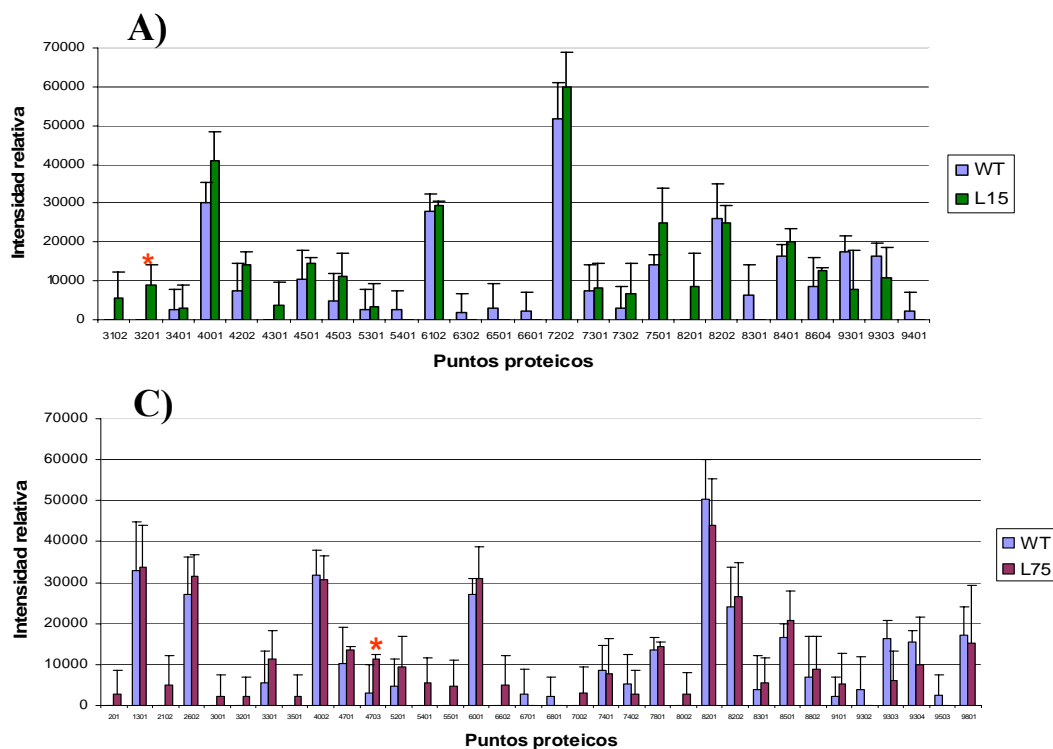
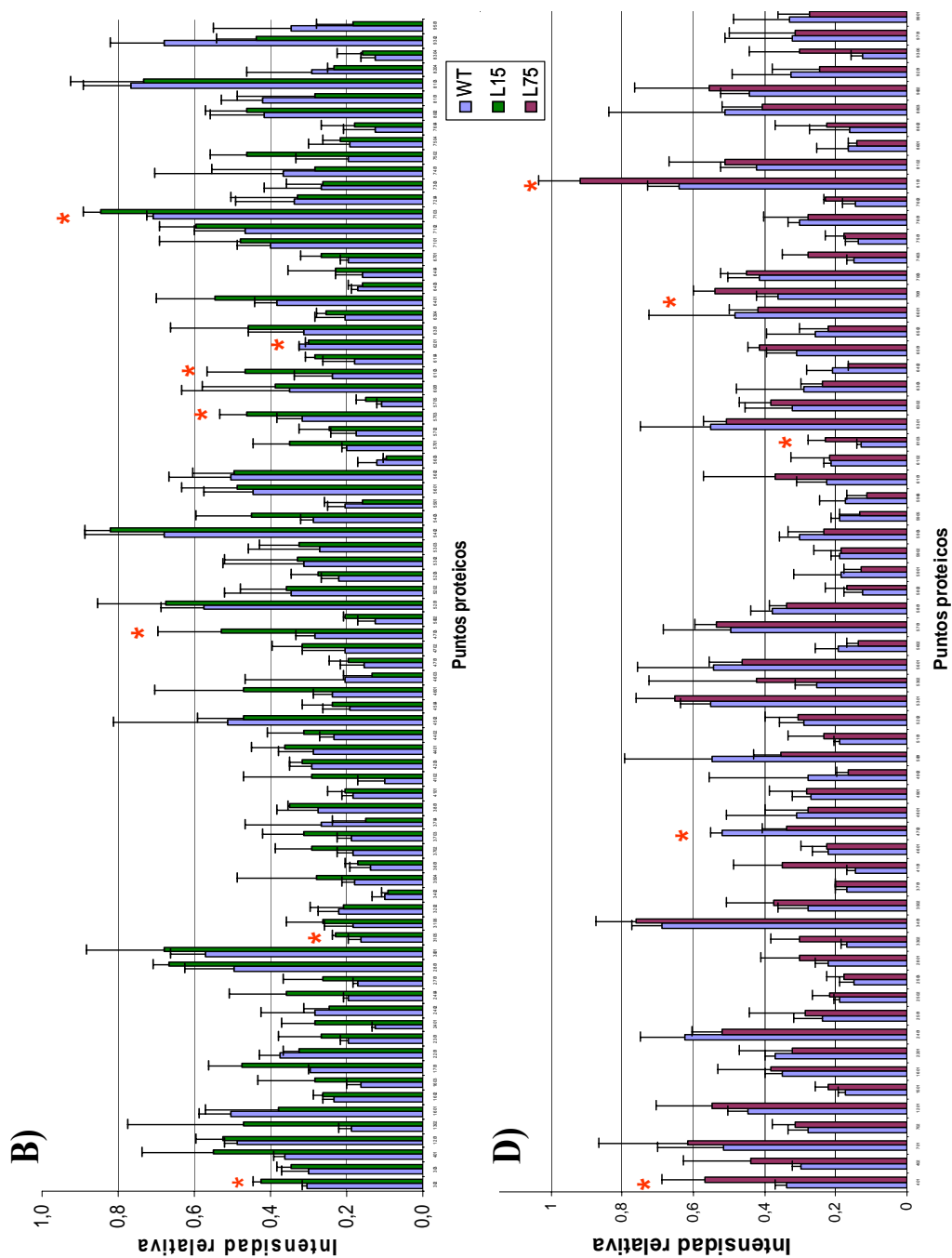


FIGURA 40: Ensayo de electroforesis bidimensional a partir de proteínas totales de cerebro. **A-B:** Análisis entre muestras de ratones silvestres y de la línea 15. **C-D:** Análisis entre muestras de ratones silvestres y de la línea 75. En el eje X se muestra la referencia dada arbitrariamente a cada punto proteico por el programa PDQuest. La intensidad relativa de los puntos proteicos está definida como la intensidad relativa a la intensidad total de los puntos válidos en el gel. Nótese la gran diferencia en la escala entre ambas gráficas dentro de cada análisis. Una diferencia significativa de $p < 0,05$ se expresa con un asterisco *.



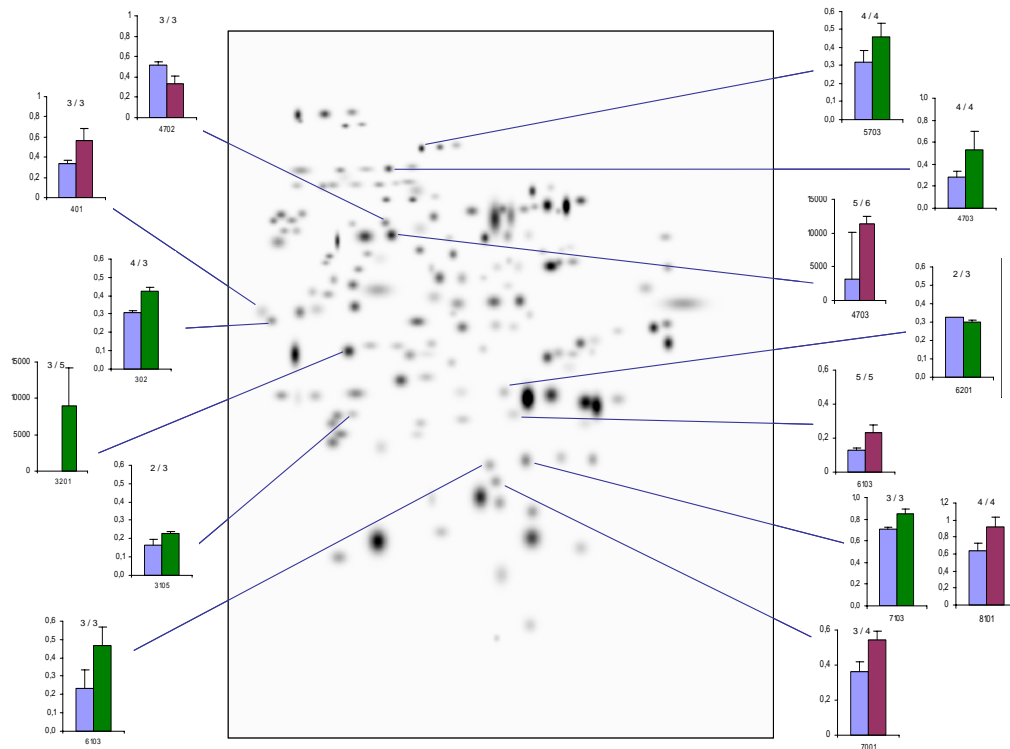


FIGURA 41: Representación de los puntos proteicos cuyo análisis estadístico a mostrado una diferencia significativa en el ensayo de electroforesis bidimensional a partir de proteínas totales de cerebro. Todos los puntos señalados de la figura han mostrado una diferencia significativa en la t de student de $p < 0,05$. Las barras de color verde representan datos de la línea 15, mientras que el color rojo la línea 75. Encima de las barras de datos se muestra la cantidad de geles de las que parten los datos.

4.9.7. Sensibilidad a la inducción de crisis epilépticas.

Dos de los fármacos ampliamente utilizados para generar modelos animales convulsivos son el AK (ácido kaínico) y el PTZ (pentilenetetrazol). Cada uno de ellos actúa sobre receptores de neurotransmisores distintos. El AK actúa positivamente sobre la ruta excitatoria glutamatergica, mientras que el PTZ es un antagonista del GABA por lo que inhibe la ruta inhibitoria gabaérgica.

Con el objetivo de examinar el efecto de la sobreexpresión de la forma mutada de LGI1 tanto sobre el sistema inhibitorio GABAérgico como sobre el sistema excitatorio glutaminérgico, aplicamos PTZ y AK a los ratones para seguidamente filmarlos y así poder evaluar mediante una escala de Racine (Racine, 1972) modificada

la amplitud del efecto de las drogas en los ratones transgénicos en comparación a los ratones silvestres.

Como paso previo, ajustamos la dosis de fármaco adecuada para los ratones utilizando aquellas extraídas de una búsqueda bibliográfica. Para ello, llevamos a cabo un experimento con 15 ratones para AK y 8 ratones para PTZ a los cuales se les inyectaron distintas dosis, 10, 20 y 30 mg/Kg para AK y 30, 45 y 60mg/Kg para PTZ. Se eligieron las dosis más bajas para ambos fármacos por resultar letales en la mayoría de los casos el resto de las dosis.

En la figura 42 se muestra la cuantificación de los parámetros medidos: tiempo de inicio de la primera crisis, duración del estupor postcrítico y el porcentaje de ratones en cada grupo con crisis epilépticas. Los ratones se observaron durante 2 horas si bien los datos mostrados son de la primera hora por haber constatado que la segunda hora no aporta datos nuevos. Además, los ratones se observaron regularmente durante una semana tras la inyección de la droga. 8 de los ratones inyectados con AK murieron en las dos horas siguientes al experimento y otros dos fallecieron entre los dos y cuatro días posteriores, todos ellos eran ratones silvestres. Ninguno de los ratones inyectados con PTZ murió durante o después de la filmación. El test t de Student revela que la susceptibilidad de los ratones transgénicos a las crisis epilépticas no se ve alterada con ninguna de las dos drogas empleadas. Es de destacar que ninguno de los ratones del grupo L75 sufrió una crisis de tipo tónico, por lo que a estos ratones se les dio un tiempo de inicio de crisis máximo (1h).

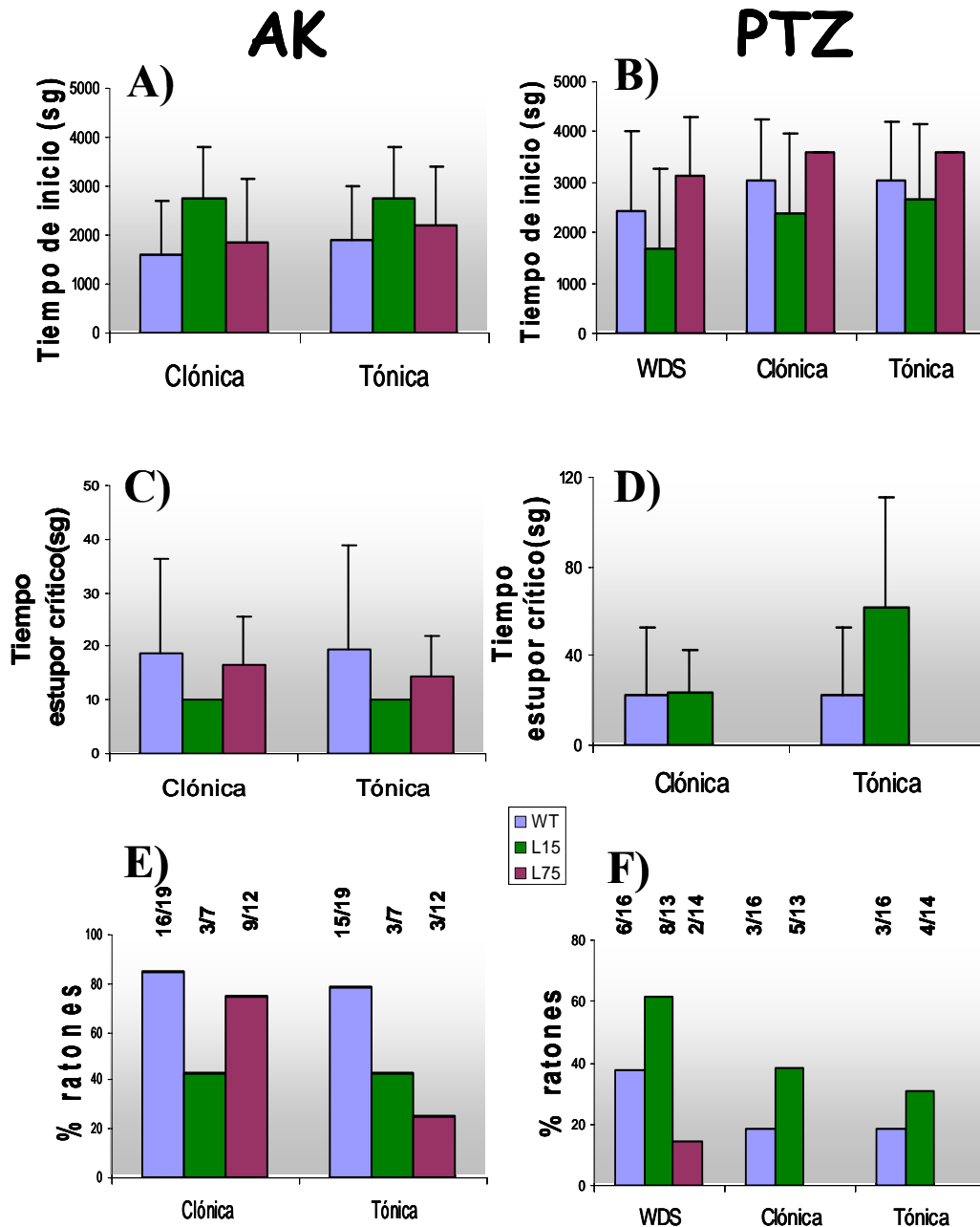


Figura 42: Inducción de crisis por AK (Ácido Kaínico) (gráficas de la izquierda) y PTZ (Pentilenetetrazol) (gráficas de la derecha). **A-B:** El tiempo (sg) desde la inyección de la droga al que se produce por primera vez cada tipo de crisis (WDS, clónicas y tónicas). **C-D:** Duración del estupor postcrítico para las crisis de tipo clónico y tónico. **E-F:** Porcentaje de ratones en cada grupo con algún tipo de crisis. Encima de las barras se muestran los datos numéricos.

Resultados

Capítulo II

Danio rerio

Los experimentos con *D. rerio* que se recogen en este apartado fueron realizados durante una estancia en el Centro de Tecnología Transgénica y Terapia Génica de la Universidad Católica de Lovaina, Bélgica, bajo la supervisión del Dr. Antonio Díez-Juan.

4.10. Expresión de LGI1 en el desarrollo de *Danio rerio*.

A partir de una genoteca de *Danio rerio* y sus secuencias de la base de datos del Centro de Tecnología Transgénica y Terapia Génica (Lovaina) identificamos un clon con un 98% de similitud en su secuencia peptídica con LGI1 de *D. rerio*, ([NM_199627](#); [zgc:65886](#)). Las bases de datos reconocen dos genes *LGI1* en *D. rerio*. El alineamiento entre la secuencia peptídica del clon con el que contamos y *lgi1a* ([AY309261.1](#)) es del 72% a nivel peptídico, mientras que el alineamiento con *lgi1b* ([AY309264.1](#)) presenta una similitud del 22% como se puede apreciar en la figura 43, lo que nos ha impulsado a escoger *lgi1a* para nuestros experimentos.

A)

CLON	65	MMCLRRRAAVLCVLLAALVLGGRRSSRC	PAPCTCSKDNALCANTGAIPRS	114
lgila	1	MMCLRRRAAVLCVLLAALVLGGRRSSRC	PAPCTCSKDNALCANTGAIPRS	50
CLON	115	FPQDVISLSFVKSGFTEIPKESFIHTPALHLL	LFTANSFDSINEDAFGL	164
lgila	51	FPQDVISLSFVKSGFTEIPKESFIHTPALHLL	LFTANSFDSINEDAFGL	100
CLON	165	PHLEYLFIENNQIKSISPF	AFRGLKSLIHLSLAYNNLETLPKDLFKGMEA	214
lgila	101	PHLEYLFIENNQIKSISPF	AFRGLKSLIHLSLAYNNLETLPKDLFKGMEA	150
CLON	215	LTKVDLRGNLFSCDCKLKWLDWMFHTNATVDQIFC	-GPEGYQGKKI	DL 264
lgila	151	LTKVDLRGNLFSCDCKLKWLDWMFHTNATVDQIFC	NGPEGYQGKKINDL	200

B)

CLON	195	SLAYNNLETLPKDLFKGMEALTKVDLRGNLFSCDCKLKWLDWMFHTNAT	244	
lgilb	1	SLAYNNLETLPRIIFKGM	DALTKVDLRGNLFSCDCKLKWLDWMFSTNAT	50
CLON	245	VDQIFC-GPEGYQGKKI	261	
lgilb	51	VDQLYCSGPSYQGKKI	67	

Figura 43: Alineamiento de la secuencia aminoacídica del clon de la genoteca utilizado para construir las sondas para *LGI1* y la secuencia de los dos genes *lgi1* descritos, *lgi1a* y *lgi1b*. **A)** La homología entre la secuencia del clon de la genoteca y la de *lgi1a* es del 72%, 196 aminoácidos de *lgi1a* son homólogos a los 274 aminoácidos secuenciados del clon. **B)** La homología entre el clon y *lgi1b* es del 22%, 59 aminoácidos de *lgi1b* son homólogos a los 274 aminoácidos secuenciados del clon.

En un primer momento, estudiamos el patrón de expresión de *LGI1* durante el desarrollo embrionario de *D. rerio*, para ello preparamos una sonda antisentido de ARNm utilizando el clon descrito anteriormente y procedimos a realizar hibridaciones *in situ* con ejemplares de las siguientes etapas del desarrollo: 5 somitas, 15 somitas, 24 hpf, 36 hpf y 48 hpf. En la figura 44 se muestra el patrón de expresión de *LGI1* en cada uno de los estadios.

En las primeras etapas, el marcaje se da en la parte anterior y a lo largo del tubo neural. A medida que el SNC se desarrolla y diferencia, el patrón de *lgi1* va remitiéndose mayoritariamente a la parte anterior del animal y sus estructuras (Telencéfalo, Mesencéfalo y romboencéfalo) tienen también un marcaje más claro. A las 48 hpf el patrón de expresión es principalmente anterior y aparece también claramente marcada la retina.

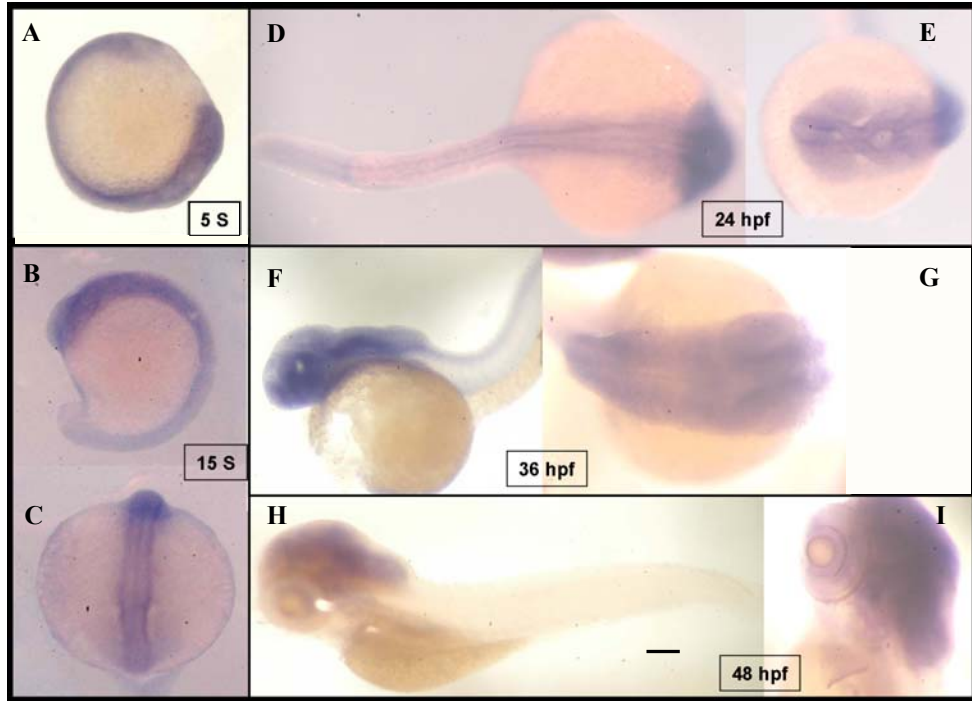


FIGURA 44: Patrón de expresión de *LGI1* en el desarrollo embrionario de *D. rerio*. **A:** Estadío de 5 somitas; vista lateral, extremo anterior hacia la derecha. **B-C:** Estadío de 15 somitas. **B:** vista lateral con extremo anterior hacia arriba. **C:** vista dorsal con extremo anterior hacia arriba. **D-E:** 24hpf; ambas vistas dorsales. **F-G:** 36hpf. **F:** vista lateral completa y detalle dorsal de la cabeza. **H-I:** 48hpf; marcaje de *LGI1* exclusiva de la cabeza y detalle de ésta. Barra de escala: 125µm (D,E,I); 160µm (G); 235µm (H); 250µm (A,B,C ,F).

4.11. Inhibición de *lgi1* durante el desarrollo embrionario de *Danio rerio*.

Eliminar o inhibir la expresión de *lgi1* en *D. rerio* creando un “knockdown” puede acercarnos a la función de *lgi1* en este vertebrado. Para ello diseñamos dos oligonucleótidos morfolino con modos de actuación diferente (Gene Tools) (Figura 45). El primero de ellos se dirigía contra el codón AUG de inicio de transcripción (bloqueando la traducción) mientras que el segundo reconoce el sitio de procesamiento alternativo entre el exón 3 y el intrón 3 (con el que se pretende eliminar este sitio de procesamiento de manera que el intrón 3 queda retenido en el ARNm y la traducción se da hasta llegar al primer codón de parada de este intrón). En la figura 46 se ofrece la localización de los oligonucleótidos utilizados en esta experimentación.

Ambos morfolinós fueron inyectados en los huevos del pez. Dejamos que se desarrollaran los embriones y los fijamos a los 3-4dpf para analizarlos.

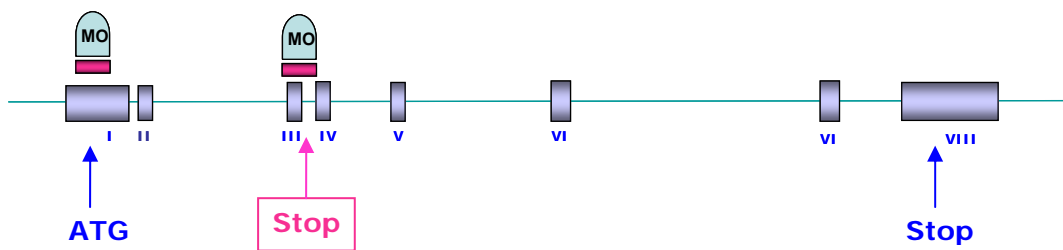


Figura 45: Esquema de la estructura de *lgi1a* con ocho exones según la información de la base de datos Ensembl (<http://www.ensembl.org/>). Los dos morfolinós (MO) empleados están representados encima de la región contra la que se han diseñado, la región de inicio de transcripción uno (ATG) y el sitio de procesamiento entre el exón 3 y el intrón 3 el otro. En números romanos azules se indican los exones del gen y la barra azul clara representa la región no codificante. En rosa se señala el codón de parada (STOP) del intrón 3.

4.11.1. Fenotipo macroscópico tras la inhibición de *LGI1* en *Danio rerio*.

A los 2 días de desarrollo tras la inyección de morfolino, se empieza a observar un fenotipo macroscópico anómalo en los embriones ya eclosionados y que se mueven libremente. Ocasionalmente alguno presenta un espasmo que puede durar de 2 a 7 segundos. Se trata de una convulsión del animal entero que gira en torno suyo (En la figura 46 se puede apreciar la secuencia de los movimientos de los peces durante un segundo y en la página de internet http://ugm.ibv.csic.es/dr_morf.html se pueden ver los vídeos de ambos grupos, AUG o morfolino y Control). Este patrón se

induce claramente aplicando una luz potente sobre los animales y/o agitando ligeramente la placa donde se encuentran los peces. Además, a los 3 días de desarrollo la proporción de peces con este fenotipo aumenta.

El grupo de peces control inyectados con tampón no presenta este patrón, tampoco los inyectados con MO-STND (un morfolino diseñado contra otra secuencia del genoma de *Xenopus* utilizado como control asiduamente por no conllevar alteraciones fisiológicas). Curiosamente, este fenotipo macroscópico sólo se ha observado en los embriones inyectados con morfolino AUG o de inicio pero nunca con el morfolino del sitio de procesamiento. Es por ello que nos centramos en el estudio del primero y abandonamos el morfolino del sitio de procesamiento.

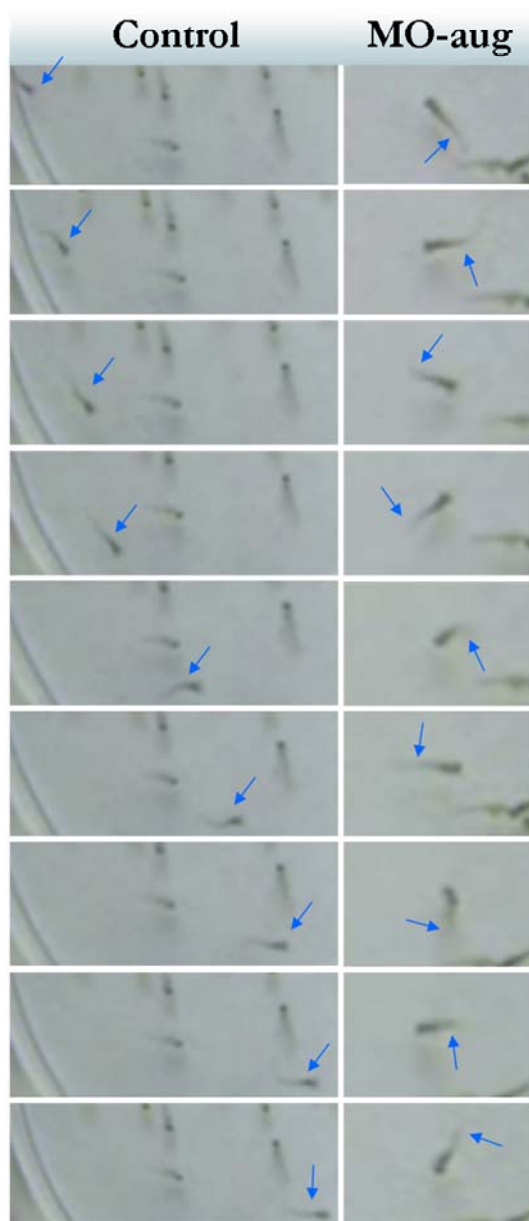


Figura 46: Fotogramas de un vídeo de dos segundos de duración. En la columna de la izquierda se muestra un ejemplar de pez cebra del grupo control inyectado con tampón mientras que en la columna de la derecha se muestra un ejemplar del grupo inyectado con el morfolino AUG o de inicio, exhibiendo el característico patrón de este grupo que gira alrededor suyo durante más de dos segundos. La flecha señala siempre el mismo punto de un mismo ejemplar, la cabeza en el caso del pez control y la parte izquierda de la cola en el caso del MO-aug. El vídeo entero de ambos grupos se puede observar en la siguiente dirección de internet: http://ugm.ibv.csic.es/dr_morf.html

4.11.2. Análisis del efecto de la inhibición de LGI1 en la integridad estructural de *Danio rerio*.

Tras inyectar el morfolino-AUG, se fijaron los embriones a los 2 y 3dpf y se procedió a realizar una batería de hibridaciones *in situ* con varias sondas cedidas por el

laboratorio del Dr. Carmeliet (Universidad de Lovaina, Bélgica), todas ellas para genes que se expresan en el sistema nervioso de *D. rerio*. Estas sondas corresponden a los siguientes genes: *TH* (Tyrosin hidroxilasa), *Prox1* (*Prospero related homeobox1*), *Sim1* (*Drosophila single-minded gene1*), *Islet2* (*Lim/homeodomain*), *Gap43* (*Nerve growth-related peptide*). Además de estos, también se utilizaron otros dos marcadores: *Znp1* (*Zin-Naphthopyr1*) y *AcT* (Alfa Acetil Tubulina), empleando anticuerpos específicos.

Por medio de estos ensayos hemos podido constatar que aparentemente la integridad estructural de los embriones inyectados con morfolino-AUG no se ve alterada. En ninguno de los casos se apreció ninguna diferencia significativa entre los embriones inyectados con morfolino y los controles (inyectados con tampón), tal como se puede apreciar en las figuras 47-50. Los marcadores utilizados fueron:

- La **Tirosina hidroxilasa** es fundamental en la fisiología de las neuronas dopaminérgicas. El marcaje que nos muestra la figura 47a-b es predominantemente de la cabeza del embrión, con las distintas estructuras cerebrales fuertemente marcadas. El patrón es el mismo tanto en el grupo control como en el inyectado con morfolino LGI1-AUG.
- El factor de transcripción neuronal **Sim1** también muestra un patrón de marcaje bien definido en la cabeza, siendo similar en ambos grupos (figura 47c-d).
- La neuromodulina **Gap43**, implicada en el crecimiento neural y axonal, muestra un fuerte marcaje en el conjunto de la cabeza del embrión (figura 47e-f). Así mismo, está descrita su expresión en neuronas Rohon-Beard (neuronas sensoriales), tal como muestra el detalle del cuerpo en la figura 47g-h, sin que se aprecien diferencias entre grupos.

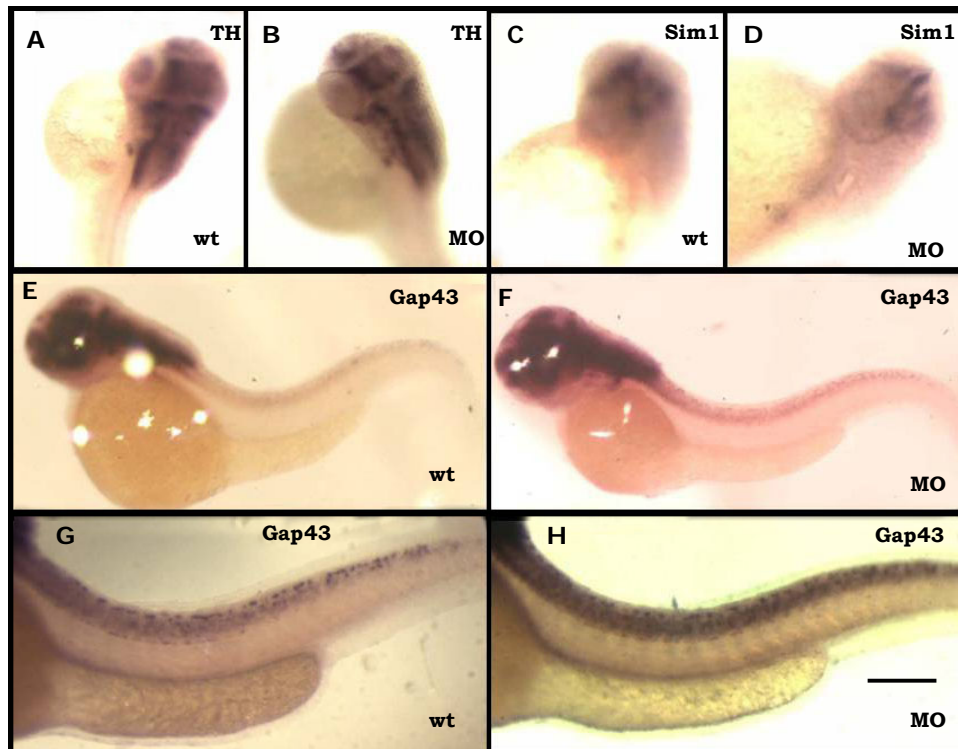


Figura 47: Hibridación in situ con sondas de TH (Tírosin hidroxilasa), Sim1 y Gap43, en embriones de 3dpf inyectados con MO anti-*lgi1*. **A-B:** vista dorsal, marcaje con TH. **C-D:** vista lateral, marcaje con Sim1. **E-H:** vista lateral, Marcaje con Gap43. **E,F:** ejemplar completo. **G,H:** detalle del cuerpo, parte anterior a la izquierda. **wt:** *wildtype* (control inyectado con tampón); **MO:** grupo inyectado con morfolino *lgi1*. Barra de escala: 250 μ m (G,H); 310 μ m (A-F).

- **Islet2** también es un factor de transcripción con cuya sonda se marcan claramente las motoneuronas de la línea lateral, tal como se aprecia en la figura 48a-b. Por otra parte, en las figuras A y B también se observa el mismo patrón en ambos grupos en la parte anterior del embrión.
- Con **Prox1** hemos querido marcar las motoneuronas primarias al igual que con Islet2 (figura 48g-h). También, al igual que con Islet2, se aprecia la retina marcada (figura 48e-f).

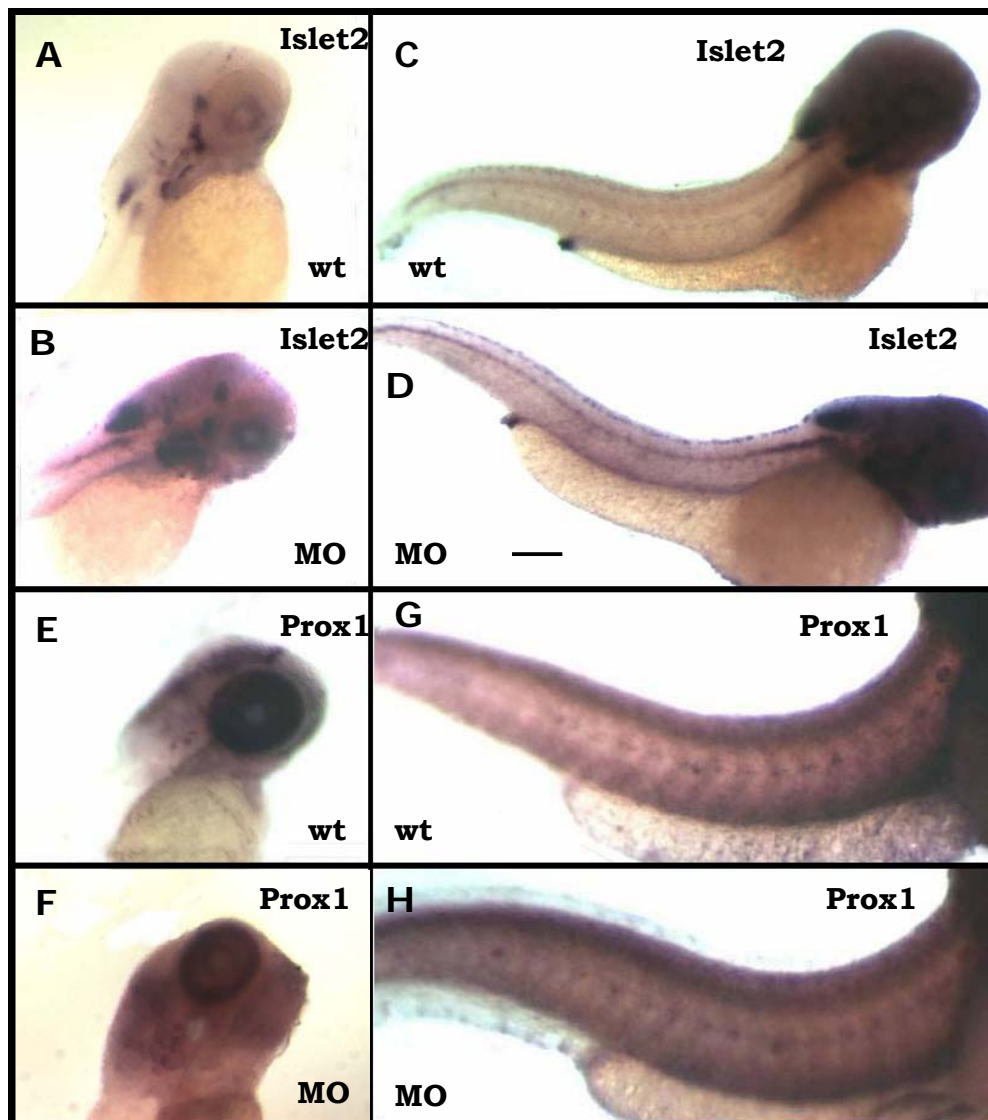


Figura 48: Hibridación in situ con sondas de Islet2 y Prox1, en embriones de 3dpf inyectados con MO anti-*lgi1*. **A-D:** marcaje con Islet2; **A,B:** detalle de la cabeza; **C,D:** embrión entero. **E-H:** marcaje con Prox1; **E,F:** detalle de la cabeza; **G,H:** detalle lateral del cuerpo, extremo anterior hacia la derecha. **wt:** *wildtype* (control inyectado con tampón); **MO:** grupo inyectado con morfolino *lgi1*. Barra de escala: 125µm (A-F); 250µm (G,H).

- La **alfa acetil tubulina** es ampliamente utilizada para estudiar las motoneuronas, su organización y extensión en el pez cebra. En la figura 49^{a-b} observamos cómo la disposición de las motoneuronas y sus axones no se altera en el grupo MO.
- Al igual que la *ACT*, el gen **Znp1** es a menudo utilizado para marcar motoneuronas primarias y sus axones. En las figuras A, B, C y D se pueden observar las motoneuronas y sus axones ordenadamente a lo largo de toda la cola. En la figura 50a-d se muestra, los rombómeros en formación en el estadio de 3dpf, perfectamente ordenados en ambos grupos.

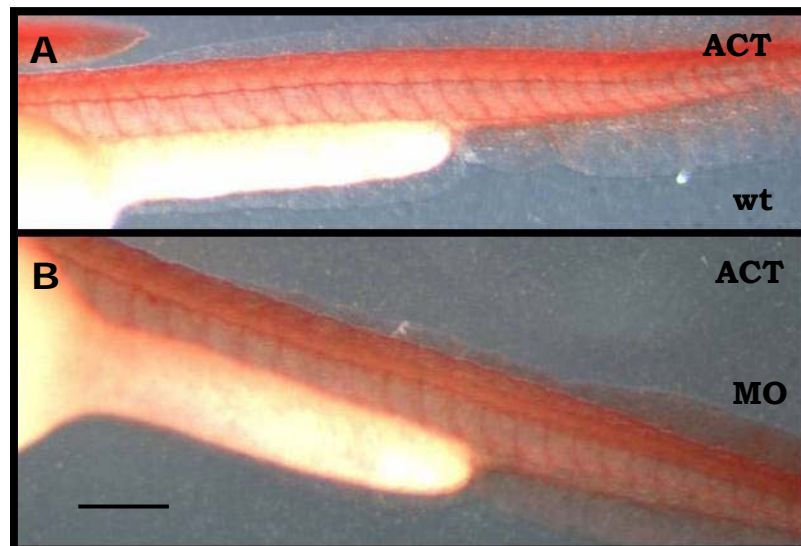


Figura 49: Inmunomarcaje con anticuerpos anti-ACT (alfa-acetil-tubulina) en embriones de 3dpf inyectados con MO anti-*lgi1*. Ambas imágenes son vistas laterales del cuerpo, parte anterior a la izquierda. **A:** *wt*: *wildtype* (control inyectado con tampón); **B:** **MO**: grupo inyectado con morfolino *lgi1*. Barra de escala: 250µm.

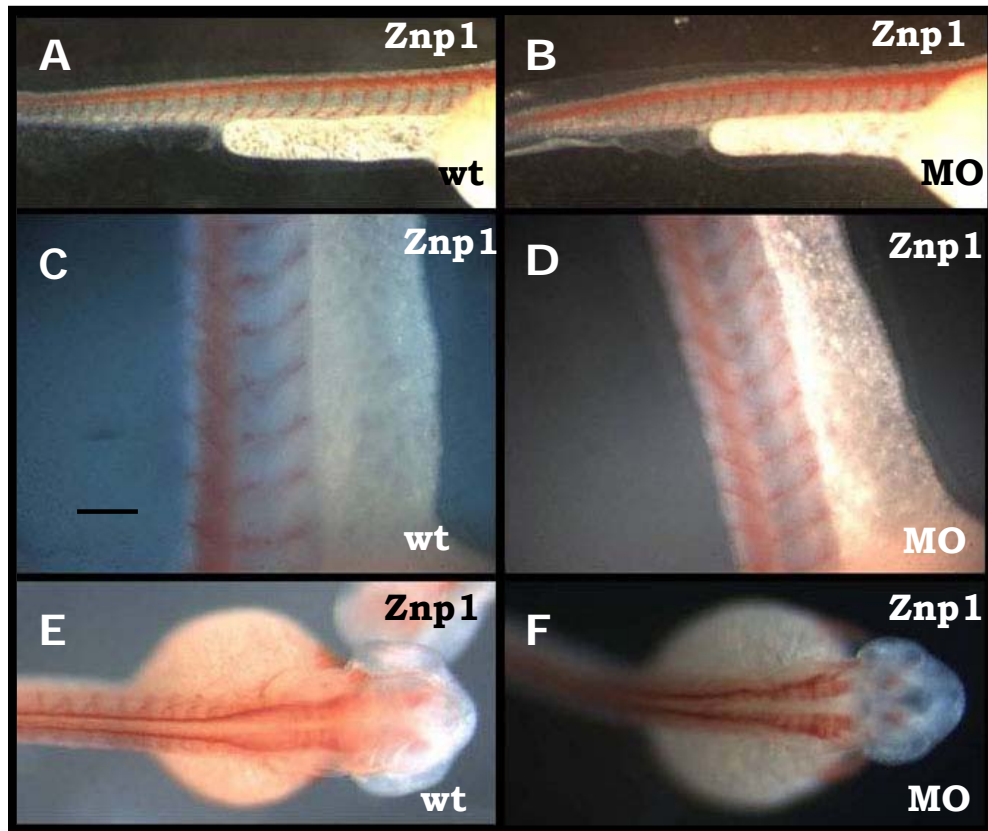


Figura 50: Inmunomarcaje con anticuerpos anti-Znp1 (○) en embriones de 3dpf inyectados con MO anti-*lgi1*. **A-D:** Vista lateral del cuerpo, parte anterior a la derecha en **A** y **B** y hacia abajo en **C** y **D**. **E,F:** Vista dorsal con el extremo anterior hacia la derecha. **wt:** *wildtype* (control inyectado con tampón); **MO:** grupo inyectado con morfolino *lgi1*. Barra de escala: 250μm (A,B,E,F); 125μm (C,D).

4.12. Sobreexpresión de *LGI1* en *Danio rerio*.

Quisimos sobreexpresar *LGI1* en *D. rerio* y lo hicimos de dos formas distintas. Primeramente, utilizamos ADNc de *LGI1* humano fusionada a la proteína GFP bajo la dirección del promotor CMV. La funcionalidad de esta construcción había sido testada con anterioridad en cultivos celulares por nuestro laboratorio. Se inyectaron los huevos y se observó la aparición de fluorescencia verde al primer día postfertilización (figura 51a) en el grupo control inyectado con el plásmido pGFP-N, siendo esta expresión más tardía en el grupo inyectado con GFP-LGI1 y siempre en

menor cantidad (Figura 51c). Los embriones se observaron hasta 7dpf, sin que ninguna diferencia en la letalidad ni en el fenotipo macroscópico se hiciera notar.

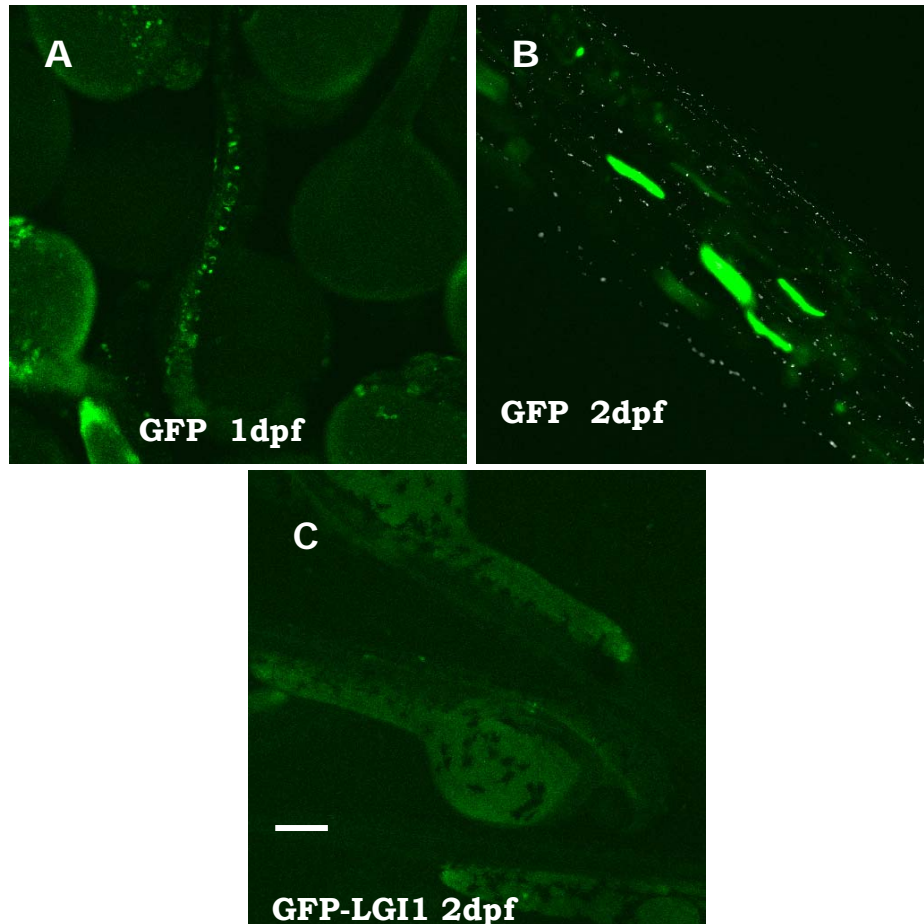


Figura 51: Microinyección de ADN en embriones de *D. rerio*. **A,B:** microinyección del plásmido pGFP-N. **A:** Embriones de un día expresando la proteína GFP. **B:** Detalle del tronco de un embrión de 2dpf expresando GFP. **C:** microinyección de la construcción GFP-LGI1 en embriones de 2dpf mostrando baja expresión de GFP. Barra de escala: 60µm (B); 250µm (A,C).

Con el objetivo de evitar la posible toxicidad del ADN, también se procedió a inyectar en los huevos de *D. rerio* el ARNm de *LGI1* sintetizado *in vitro*. Los resultados obtenidos con esta aproximación no son distintos de los que se observaron al utilizar ADN para la sobreexpresión de *LGI1*.

Resultados

Capítulo II

Xenopus laevis

En el momento de plantearnos los experimentos mostrados en este apartado, si bien por la estructura genómica de *LGI1* se descartaba que este fuese un canal iónico, la posibilidad de que interaccionase con otro canal estaba abierta, sobretodo si se tiene en cuenta que todos los genes conocidos hasta la fecha responsables de un síndrome epiléptico son proteínas que codifican para canales de membrana (Turnbull *et al.*, 2005). En este contexto, nos propusimos, con la colaboración del Dr. Álvaro Villarroel (el aquel momento científico titular del CSIC en el Instituto de Neurobiología “Ramón y Cajal” de Madrid), emplear un sistema de expresión heteróloga ampliamente utilizado como son los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*, para estudiar la posible relación de *LGI1* con la transmisión del impulso nervioso.

4.13. Expresión funcional de *LGI1* junto con canales de potasio dependientes de voltaje en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Tras sintetizar *in vitro* el ARNm mensajero de *LGI1*, este se inyectó en ovocitos de *Xenopus* los cuales se registraron mediante la técnica electrofisiológica de *voltaje-clamp*. Es posible que el efecto de *LGI1* solamente pueda observarse en presencia de alguna proteína con la que interaccione *in vivo*, por ello se procedió a la coinyección de mensajero de *LGI1* con mensajeros de los siguientes canales y receptores conocidos: *Kv1.2* (canal de potasio dependiente de voltaje de la familia *Shaker* o *KCNA2*), *KCNQ2* (canal de potasio 2 dependiente de voltaje de la familia *kqt*), *KCNQ3* (canal de potasio 3 dependiente de voltaje de la familia *kqt*), *EAG1* (canal de potasio dependiente de voltaje de la familia *h*, *KCNH1* o *ether à go-go*). El canal *Shaker KV1.1* se utilizó como control por su corto y característico patrón de la corriente.

Todos los canales expresaron sus corrientes respectivas cuando se inyectaron por separado (Figura 52) y no se observó ninguna diferencia en las corrientes cuando se coinyectaron los canales junto con *LGI1*. Tampoco se registró corriente alguna en los ovocitos inyectados únicamente con *LGI1*. La Tabla 27 resume las combinaciones experimentadas en los ovocitos. Los mismos experimentos se realizaron con la forma mutada de *LGI1* sin que se observasen diferencias en las corrientes registradas.

TABLA 27: Grupos de ARNm microinyectados en los ovocitos. Los grupos 5, 6 y 7 constan de *LGI1* junto con los canales de potasio. Los controles para estos tres grupos son los grupos 1, 2, 3 y 4.

GRUPO	1	2	3	4	5	6	7
	<i>LGI1</i>	<i>Kv1.2</i>	<i>EAG1</i>	<i>KCNQ2</i> <i>KCNQ3</i> <i>SH</i>	<i>LGI1</i>	<i>LGI1</i>	<i>LGI1</i>
ARNm	<i>LGI1</i>	<i>Kv1.2</i>	<i>EAG1</i>	<i>KCNQ2</i> <i>KCNQ3</i> <i>SH</i>	<i>KV1.2</i>	<i>EAG1</i>	<i>KCNQ2</i> <i>KCNQ3</i> <i>SH</i>

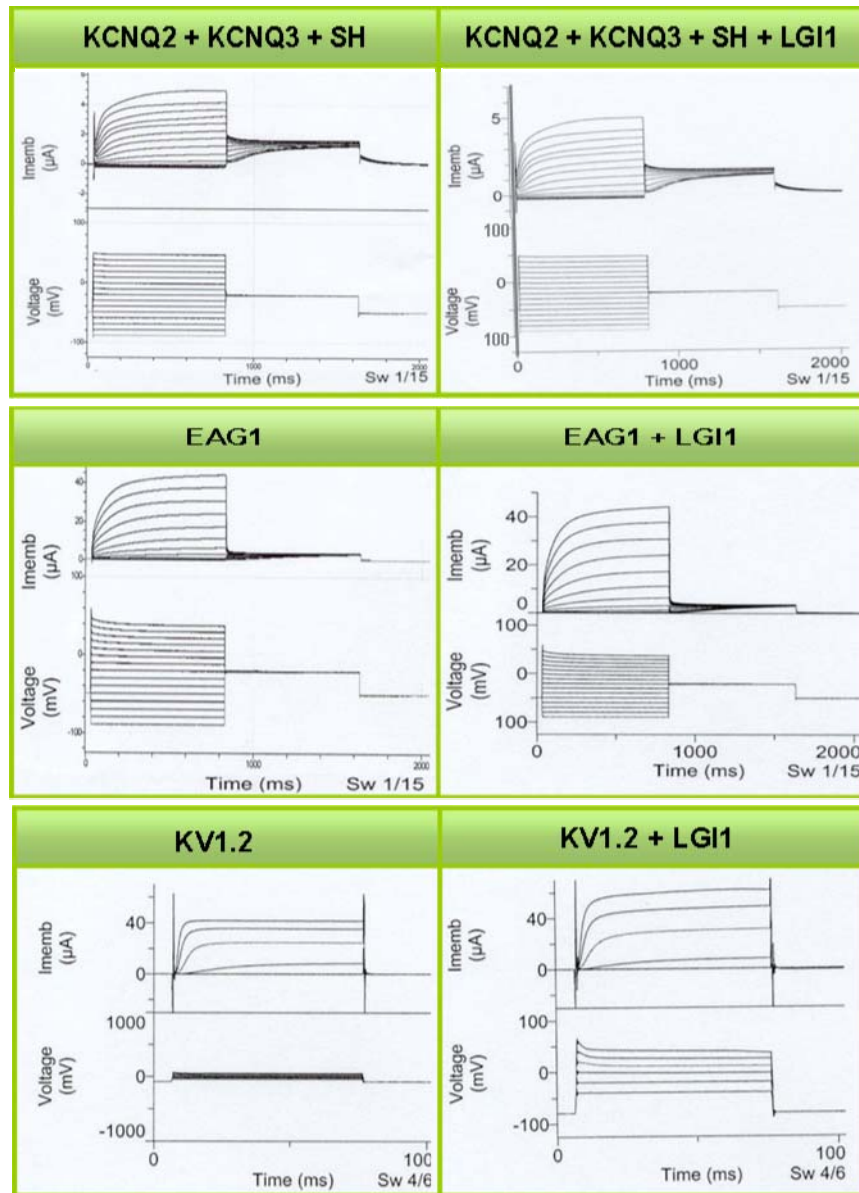


Figura 52: Registros electrofisiológicos de la coexpresión de *LGI1* junto con los canales de potasio dependientes de voltaje *KCNQ2*, *KCNQ3*, *SH*, *EAG1* y *Kv1.2*. En la columna de la izquierda se muestran los registros de los ovocitos con expresión de los canales de potasio únicamente, mientras que en la columna de la derecha se muestran los registros obtenidos tras la coexpresión de los canales junto con *LGI1*.

Discusión

En este trabajo se describen mutaciones en el primer gen causante de epilepsia en humanos que no codifica para un canal iónico.

En los últimos 20 años el estudio de las epilepsias monogénicas ha aportado gran cantidad de datos acerca de la fisiopatología que se encuentra detrás de un grupo tan amplio y variado de enfermedades como son las epilepsias. A pesar de que corresponden a un pequeño porcentaje del total, la facilidad relativa para la identificación del defecto molecular responsable de su aparición en comparación con las epilepsias no monogénicas, las ha hecho diana de multitud de estudios genético-moleculares.

La identificación en 1995 del primer gen responsable de un síndrome epiléptico idiopático (mutaciones en el receptor nicotínico neuronal de acetilcolina 4 (*CHRNA4*) en la Epilepsia Familiar Nocturna del Lóbulo Frontal (Steinlein *et al.*, 1995) permitió establecer la primera correlación entre una función relacionada con la conducción eléctrica neuronal y la patología epiléptica. Desde entonces se han identificado mutaciones en un total de 15 genes codificantes para subunidades de canales iónicos dependientes de voltaje o de ligando, demostrando que tanto el aumento de los mecanismos excitatorios como la disminución del control inhibitorio de la conducción nerviosa son capaces de generar una hiperexcitabilidad y desembocar en una patología epiléptica. Sin embargo, el hecho de que la mayoría de epilepsias para las que se conoce el gen responsable estén causadas por defectos en canales iónicos o en sus subunidades accesorias no ha de implicar necesariamente que éste sea el único mecanismo. En teoría, defectos genéticos que alteren la plasticidad neuronal, la formación de las redes neuronales durante el desarrollo o el metabolismo neuronal podrían conducir igualmente a desajustes en la actividad eléctrica de las neuronas y a un fenotipo epiléptico.

El gen responsable de la Epilepsia Lateral Temporal Autosómica Dominante que se identifica y se caracteriza en este trabajo es el primer ejemplo conocido de mutaciones en un gen que no codifica para un canal iónico causantes de epilepsia en humanos. Previamente se habían identificado dos genes responsables de los fenotipos observados en dos cepas de ratón caracterizados por crisis audiogénicas (causadas por un estímulo auditivo): el receptor de serotonina tipo 2C (5-HT_{2C}) (Brennan *et al.*, 1997) y el gen *Vlgr1* identificado inicialmente como el *locus Mass1* causante de epilepsia audiogénica en el ratón *Frings* (Skradski *et al.*, 1998; Skradski *et al.*, 2001) pero no se había podido relacionar a sus ortólogos en humanos como causantes de epilepsia.

LGI1 es un gen relativamente pequeño, con 8 exones y los estudios de expresión por *Northern blot* publicados previamente mostraban una expresión

Discusión

restringida principalmente al cerebro con amplia distribución en las diferentes áreas y, aunque se había predicho su localización transmembrana, su estructura claramente no correspondía con un canal.

La primera mutación identificada en la secuencia de *LGI1* (c.758delC) se encontró en la familia vasca (ADLTE01) en la que se había acotado el haplotipo mínimo de 15cM en 1999 (Poza *et al.*, 1999), sin embargo la segunda mutación (c.1420C>T) se identificó en una familia de tan sólo cuatro miembros (ADLTE03), tres de ellos afectados, en la que no se había podido comprobar el ligamiento.

El hecho de haber detectado dos mutaciones diferentes en el mismo gen en dos familias no relacionadas pero afectadas por el mismo síndrome, sumado al hecho de no encontrar esos mismos cambios al analizar muestras de población control del mismo grupo étnico, identifica a *LGI1* como el gen responsable de la patología, al menos en estas familias. Además, otro criterio que apoya la patogenicidad de las mutaciones es que afectan a sitios conservados entre *LGI1*s de distintas especies. Por esta razón se propuso un nombre alternativo para la proteína codificada por este gen haciendo referencia a la epilepsia parcial del lóbulo temporal, denominándose Epitempina.

Además de las dos mutaciones que se describen en este trabajo, hasta la fecha se han encontrado un total de 19 mutaciones en la secuencia de *LGI1* en familias con Epilepsia Lateral Temporal Autosómica Dominante (Gu, Brodtkorb *et al.*, 2002; Kalachikov *et al.*, 2002; Fertig *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2003; Michelucci *et al.*, 2003; Berkovic *et al.*, 2004; Hedera *et al.*, 2004; Ottman *et al.*, 2004). Aunque las características clínicas presentan variaciones entre las familias, todas ellas se caracterizan por una predominancia de crisis parciales de inicio en lóbulo temporal lateral con un componente auditivo o afásico.

Las mutaciones, encontradas en todos los casos en heterozigosis, provocan la aparición de proteínas truncadas de diferente tamaño o bien cambios puntuales de un aminoácido por otro. Las mutaciones se distribuyen a lo largo de toda la secuencia de *LGI1* no encontrándose regiones con mayor concentración de cambios. Tampoco se han encontrado diferencias evidentes en el fenotipo asociadas al impacto de la mutación sobre la proteína, a pesar de que algunas de las mutaciones provocan la aparición de codones de parada muy prematuros.

En la literatura están descritos varios polimorfismos, tanto en la región codificante como en la región promotora descrita por Somerville (550pb por encima del primer codón codificante en el ARNm) (Kalachikov *et al.*, 2002; Nakayama *et al.*,

2003; Berkovic *et al.*, 2004). En las bases de datos públicas sin embargo si bien hay más de 150 polimorfismos intrónicos descritos, sólo hay 3 polimorfismos descritos en la región codificante (exón 6 y 8), dos de los cuales implican un cambio de aminoácido. La región promotora es una zona muy conservada entre especies y no encontramos ningún polimorfismo en humanos. Al alejarnos aún más hacia el extremo 5', donde las secuencias conservadas empiezan a disminuir, las bases de datos nos muestran 4 polimorfismos, ninguno de ellos en humanos y todos ellos en zonas poco conservadas entre especies.

En nuestro estudio, no hemos localizado ningún nuevo polimorfismo en la población control analizada lo que corrobora la escasa variabilidad que afecta a la región reguladora de *LGI1* e indica que anomalías en el nivel de expresión de este gen no están relacionados con la ADLTE.

ADLTE es un síndrome genéticamente heterogéneo.

Las familias que se analizan en este trabajo presentan un fenotipo compatible con ADLTE aunque con ligeras variaciones. Las epilepsias son un conjunto muy extenso de síndromes con características clínicas que no siempre son sencillas de identificar y clasificar. Este hecho, junto a la variabilidad existente entre individuos afectados del mismo síndrome epiléptico, hace difícil su diagnóstico. La característica definitoria en este caso para la selección de las familias, fue la presencia en el caso *propositus* de crisis parciales con componente auditivo y frecuente generalización secundaria, aunque también se encontraron crisis con componente visual o cursando con afasia (Poza et al en revisión).

Tal como ya se ha dicho, sólo se encontraron mutaciones en dos de las familias analizadas. El resto de familias disponibles se sometió al mismo estudio pero no se identificaron cambios en la secuencia de *LGI1* en ninguno de los afectados. Esto puede ser debido a la metodología utilizada para el rastreo de mutaciones. En efecto, la amplificación y posterior secuenciación de los exones, incluyendo un pequeño fragmento de la región intrónica circundante, no permite identificar microdeleciones de exones completos, mutaciones en la región intrónica no analizada que puedan afectar al procesamiento, o cambios que afecten a la secuencia del promotor. Por otro lado, el grupo del Dr. Carlo Nobile ha buscado mutaciones en la región promotora de *LGI1* en familias ADLTE sin encontrar ninguna (C. Nobile, comunicación personal).

Discusión

Una vez identificado *LGI1* como gen causante de ADLTE y dado que podía haber mutaciones, deleciones de exones enteros o cambios en intrones que afecten a la proteína que no serían detectados mediante la metodología utilizada, nos planteamos analizar la existencia de ligamiento de la enfermedad en estas familias con el locus 10q24.

En dos de las familias pudimos excluir el ligamiento (ADLTE02 y 08) mientras que otras tres daban resultados que no alcanzaban el límite de significatividad estadística suficiente (ADLTE04, 06 y 07). Estos datos, junto con la ausencia de mutaciones en estas familias, apuntan a una heterogeneidad genética de la enfermedad. En este sentido, se han descrito familias con fenotipos compatibles con ADLTE en las que se ha descartado ligamiento a la región 10q24 (Bisulli *et al.*, 2002; Michelucci *et al.*, 2003; Berkovic *et al.*, 2004)

El estudio de simulación realizado revela que ninguna de las familias tiene la potencia estadística suficiente para justificar una búsqueda genómica por separado según el modelo de herencia utilizado, sin embargo, la suma de los valores de LOD medios obtenidos (3,233) sí justificaría dicho análisis.

Por otra parte, la construcción de los haplotipos nos ha permitido observar cómo en las familias ADLTE06 y 07 el haplotipo, distinto en ambas familias, segrega con la enfermedad, lo cual nos podría hacer pensar en mutaciones no detectadas en estas familias. Curiosamente, las dos familias con mutaciones en *LGI1*, ADLTE01 y 03, comparten el haplotipo formado por los marcadores más cercanos y flanqueantes de *LGI1* (D10S185, D10S200, D10S1680, D10S677 y D10S520). Estas dos familias son de distinto origen (ADLTE01 es de origen vasco mientras que ADLTE03 es una familia andaluza) y además las mutaciones en *LGI1* de cada familia son distintas, por lo que descartamos un origen fundador. Esta similitud, será debida seguramente a la alta frecuencia de los alelos de estos marcadores que forman el haplotipo.

Resumiendo, y si bien no se descartan mutaciones en regiones no codificantes, así como macrodeleciones, es muy probable que ADLTE sea una enfermedad genéticamente heterogénea. Genes alternativos como son los parálogos de *LGI1*, *LGI2*, *LGI3* y *LGI4* han sido estudiados también en el laboratorio (Ayerdi-Izquierdo, 2006), sin encontrar alteraciones relacionadas con la aparición de esta enfermedad, por lo que urgen nuevos estudios para buscar otros *loci* responsables de ADLTE. La única asociación genética encontrada entre un gen de la familia LGI con una enfermedad es la observada por Gu y cols. entre polimorfismos exónicos en *LGI4* y la epilepsia con ausencias juveniles (Gu *et al.*, 2004).

La sobreexpresión de la forma silvestre de *LGI1* en ratones podría resultar letal en el desarrollo embrionario.

Hasta la fecha no hay ningún dato publicado sobre modelos transgénicos murinos de *LGI1*. Nosotros, una vez descrito *LGI1* como el gen responsable de ADLTE, quisimos desarrollar un ratón transgénico de sobreexpresión de *LGI1* que nos sirviese de modelo en la búsqueda de la función y mecanismos de acción de *LGI1*. Son numerosos los trabajos realizados con ratones de sobreexpresión de genes del SNC (Aloe *et al.*, 1999; Engel *et al.*, 2006), así como los resultados obtenidos de ellos. El modelo más aproximado al estado genético de un enfermo de ADLTE sería un *knock-in*, es decir, un ratón al que se le reemplaza un alelo del gen a estudiar, en este caso *LGI1*, por la secuencia mutada encontrada en los enfermos. De esta forma, el ratón, al igual que el paciente, portará la mutación en heterocigosis. Sin embargo, y dado la benignidad de este síndrome epiléptico, otro tipo de modelos como el *knock-out* o el transgénico de sobreexpresión nos podrían mostrar más claramente el papel que desempeña *LGI1*. Dada la sencillez relativa de la técnica de microinyección puesta ya a punto por el Servicio de Transgénesis del IBV, nos propusimos generar un ratón que sobreexpresase *LGI1* y otro que sobreexpresase la mutación en este gen encontrada en la familia ADLTE01.

En el momento de comenzar este trabajo, en nuestro laboratorio estábamos generando anticuerpos para *LGI1*, incluyendo unos específicos para las formas mutadas descritas en nuestras familias. Por esta razón no creímos necesario incluir un epítipo en el transgén, que por otra parte podría enmascarar o alterar el efecto de la proteína. Sin embargo, los anticuerpos producidos no han resultado de suficiente calidad para poder ser utilizados en el laboratorio, al igual que ha sucedido con anticuerpos desarrollados por otros grupos o disponibles comercialmente.

Tras varios intentos en distintos laboratorios de generación de animales transgénicos, no hemos tenido éxito en la obtención de un ratón que sobreexprese la forma silvestre de *LGI1*. Y si bien en un principio creímos que podría deberse a la insuficiente eficiencia de la técnica y por lo tanto a la necesidad de aumentar el número de ensayos, también sospechamos que la sobreexpresión de *LGI1* podía resultar letal en el desarrollo embrionario. Para demostrar esta hipótesis, el primer paso fue determinar el tiempo de activación del promotor detectando la presencia del transgén a lo largo del desarrollo. Dado que la expresión de *LGI1* estaba descrita mayormente en el cerebro, decidimos dirigir la expresión del transgén al SNC valiéndonos de un promotor específico como es el *Thy1.2*. Este es un gen

Discusión

extensamente caracterizado (Gordon *et al.*, 1987) y cuyos elementos reguladores se han utilizado para dirigir la expresión de genes en el SNC (Luthi *et al.*, 1997; van der Putten *et al.*, 2000; Campsall *et al.*, 2002). Sin embargo, hay discrepancia en la literatura en cuanto al momento de activación del *cassette* transgénico *Thy1.2*. Varios autores sitúan el momento de activación del promotor en la segunda semana postnatal (Vidal *et al.*, 1990) (Kahle *et al.*, 2001) mientras que otros como Campsall (Campsall *et al.*, 2002) detectan una expresión tan temprana como E12 y E14, dependiendo de la línea de ratones analizados. Tampoco se descarta la existencia de variabilidad entre distintas cepas de ratón. Dada la diversidad de datos publicados al respecto, decidimos determinar nosotros mismos el tiempo de activación de *Thy1.2* en la cepa de ratones B6D2F1.

Utilizamos los transgénicos que sobreexpresan la forma mutada 01 para interrumpir el embarazo en distintos tiempos del desarrollo y poder estudiar por RT-PCR a tiempo real el momento de activación del promotor *Thy1.2*. Con estos ensayos pudimos constatar la expresión del transgén a partir del día 11 de gestación. Utilizando un ratón transgénico que sobreexpresa la proteína fluorescente GFP dirigido por el mismo promotor *Thy1.2*, pudimos observar que el promotor *Thy1.2* se encuentra desactivado en el día E9. Con estos datos decidimos microinyectar el transgén LGI1wt y analizar embriones E9 en los que deberíamos observar, dada la eficiencia de la técnica (21,4% crías transgénicas), al menos un embrión positivo portador del transgén sin expresar. Desafortunadamente, sólo se pudo estudiar una camada de embriones E9 y ninguno de ellos resultó portar el transgén. En estas circunstancias, habría que aumentar el número de embriones E9 a fin de determinar si la tasa de transgénicos es menor a la esperada por esta técnica. Si así fuera, y dada la variabilidad del tiempo de activación en las distintas líneas transgénicas descrita en la literatura, será necesario estudiar embriones en estadios más tempranos.

En el caso de que efectivamente la sobreexpresión de LGI1 sea letal, el hecho en sí denota la importancia que puede tener este gen en el desarrollo embrionario y conociendo la expresión mayoritaria del gen en el SNC, en la neurogénesis. Varios trabajos nos hablan de una letalidad debido a la mutación, eliminación o sobreexpresión de genes implicados en la neurogénesis y por lo tanto expresados mayormente en el SNC (Lee *et al.*, 2000; Barsi *et al.*, 2005).

Con el objetivo de solventar este problema originado por la posible letalidad de la sobreexpresión de *LGI1*, estamos desarrollando un nuevo modelo murino de *LGI1* condicional en el que la expresión del transgén está también regulada por el promotor *Thy1.2* pero en el que podremos activar la expresión de *LGI1* cuando lo consideremos

adecuado gracias a un sistema TET-ON y podremos así evitar la muerte del ratón transgénico en el desarrollo embrionario.

Se generaron dos líneas de ratones transgénicos de sobreexpresión de la forma mutada que difieren en el nivel de expresión del transgén.

La falta de anticuerpos que funcionen adecuadamente en Western blot ha hecho imposible la caracterización y cuantificación del transgén a nivel de proteína. Sin embargo, sí hemos podido estudiar la sobreexpresión de LGI1-m01 a nivel de ARNm en las dos líneas de transgénicos establecidas. Hemos observado cómo la expresión del transgén en la línea con 75 copias es casi el doble a la de la línea con 15 copias, por lo que no se podría establecer una relación lineal entre el número de copias y la cantidad de ARNm en lo que a este rango de copias se refiere. Puede que exista una relación proporcional con 15 copias de transgén, pero seguramente 75 sea un número demasiado elevado para mantener la maquinaria de transcripción al mismo ritmo y con la misma capacidad.

El nivel de ARNm del transgén se estudió en cerebro, músculo esquelético y corazón. Además de constatar la especificidad del promotor *Thy1.2* para el SNC, con este estudio corroboramos los resultados obtenidos por *Northern-blot* y RT-PCR (Chernova *et al.*, 1998), por los cuales sabemos que *LGI1* se expresa aunque sea minoritariamente en músculo esquelético y corazón entre otros tejidos, ya que la sonda TaqMan utilizada, además del transgén, reconoce también el gen *Lgi1* endógeno del ratón. De hecho, en el cálculo la cantidad relativa de ARNm expresada se obtuvo tras tomar en consideración la expresión endógena en los animales silvestres.

Nótese que en este modelo animal que hemos desarrollado, si *LGI1* tuviera alguna función relevante específico de tejidos fuera del SNC, aquellos no analizados por nosotros, ésta no se vería alterada. De todas formas, nuestro objetivo principal es indagar en la implicación que *LGI1* tiene en epilepsia y para ello nos ha parecido conveniente restringir la expresión del transgén a la zona de mayor expresión del gen silvestre.

La sobreexpresión de la forma mutada 01 de *LGI1* no altera el fenotipo de los ratones.

Los ratones de sobreexpresión de la forma mutada 01 de *LGI1* tienen un fenotipo macroscópico normal; no se ha observado ninguna anomalía en ninguna de las dos líneas establecidas.

A pesar de ello, y para poder confirmar que la sobreexpresión del transgén no afecta a las funciones básicas del SNC, planeamos una batería de pruebas estandarizadas de comportamiento, cognitivas y motoras, por la que pasamos ambas líneas de ratones. Estas pruebas no han demostrado ninguna diferencia significativa entre el grupo control y los grupos transgénicos. También se puede decir que no hay diferencias significativas entre las dos líneas de transgénicos. Las ligeras tendencias que se aprecian por ejemplo en la prueba de rota-rod, pueden deberse a la simple acumulación de proteína, pero es improbable que se deban a la funcionalidad del transgén.

En el principio del proyecto no se previó la necesidad de hacer pruebas comportamentales y por eso se seleccionó una cepa, la B6D2F1, que si bien es ampliamente utilizada por su alta eficiencia en la obtención de fundadores, así como su alta tasa de reproducción, resulta poco adecuada para este tipo de pruebas. Otras cepas como C57BL/6J son más adecuadas y utilizadas para este tipo de estudios (Stavnezer *et al.*, 2002; Bothe *et al.*, 2004).

Creemos que, aún con sus limitaciones, este ratón transgénico es un modelo válido para el estudio de la implicación de *LGI1* en el SNC, ya que no se ha visto que el transgén afecte colateralmente aspectos motores, cognitivos o morfológicos del ratón.

La interacción *in vitro* de *LGI1* con el receptor p75^{NTR}/NgR/Lingo1 no se traduce en una alteración de sus niveles en el modelo transgénico generado en este trabajo.

Resultados obtenidos a partir de un ensayo de Doble Híbrido en levadura llevado a cabo en nuestro laboratorio junto con ensayos de coIP (coimmunoprecipitación) en un sistema de líneas celulares de mamífero sugieren una relación funcional entre *LGI1* y moléculas implicadas en la regulación del crecimiento de neuritas en el SNC de mamíferos, concretamente con los receptores NgR, p75^{NTR} y Lingo1, implicados en la inhibición del crecimiento por mielina (Barker, 2004).

Al no tratarse de un canal iónico, *LGI1* podría estar implicado en la aparición de la patología epiléptica por un mecanismo totalmente diferente, el cual diversos autores han sugerido que podría estar relacionado con fallos en el establecimiento de los circuitos neuronales durante el desarrollo mediado por moléculas guía, proponiendo un papel de *LGI1* en la guía de los axones, aunque hasta el momento no se han publicado evidencias experimentales que apoyen esta hipótesis. *LGI1* es el primer gen no iónico identificado en epilepsia idiopática y por eso mismo no sería descabellado pensar que su papel en la generación de crisis epilépticas difiere profundamente de los mecanismos epileptogénicos hasta ahora conocidos.

Por otra parte, nuestro grupo (Sirerol-Piquer *et al.* En revisión) y otros (Senechal *et al.*, 2005) han demostrado que *LGI1* se secreta constitutivamente *in vitro* y que además es capaz de unirse de manera específica y dependiente de dosis a la membrana de células en cultivo, lo cual corrobora la existencia de un receptor específico en la membrana para *LGI1*.

Con estos datos como base, *LGI1* se erige como un buen candidato para actuar como mediador de la atenuación del ambiente inhibitor necesaria para los procesos de plasticidad neuronal, ejerciendo su función probablemente a través de la interacción con los receptores implicados en el proceso de inhibición por mielina. Esta hipótesis de función de *LGI1* podría ser compatible con su implicación en un fenotipo epiléptico. Se podría hipotetizar que mutaciones en *LGI1* podrían conducir a errores en procesos de remodelación sináptica que fácilmente podrían desembocar en una hiperexcitabilidad anómala provocando crisis epilépticas.

Los experimentos *in vitro* de nuestro laboratorio han demostrado que *LGI1* interacciona con este complejo receptor por lo que juzgamos que sería interesante observar si los niveles de estas proteínas estaban alterados en los ratones transgénicos. Abordamos este ensayo a nivel de ARNm utilizando la técnica de RT-PCR a tiempo real. Ya se ha descrito cómo los niveles de los tres ARNms, NgR, p75^{NTR} y Lingo1, no se ven alterados en los ratones transgénicos.

Que *LGI1* interactúe con estas proteínas no quiere decir que anomalías en la expresión de *LGI1* afecten irreversiblemente al nivel de expresión de estas proteínas. La función que ejerce *LGI1* sobre este complejo receptor podría estar alterada y aún el nivel de expresión del complejo no estarlo, sobre todo cuando se toma en consideración que los elementos del complejo participan a su vez en otros complejos distintos, lo que podría enmascarar ligeros cambios en la expresión de alguno de sus miembros debido a la presencia de la forma mutada de *LGI1*. Por otra parte, los experimentos *in vitro* podrían estar condicionados o descondicionados de forma que

Discusión

en un modelo *in vivo* la realidad del mecanismo sea otra y por eso mismo no se observe interacción entre la sobreexpresión de LGI1 y estas proteínas.

Cabe la posibilidad de que la interacción observada por coIP en nuestro laboratorio sea el reflejo de una compatibilidad molecular debida a la presencia de dominios de LRRs en este grupo de moléculas y que alguna de estas interacciones nunca llegue a darse *in vivo*. Es posible también que estas interacciones nunca se den *in vivo* debido a que las proteínas se expresen en distintas células o en distintos momentos.

Un dato importante en esta teoría según la cual *LGI1* se uniría a un receptor de membrana es el hecho demostrado por nuestro grupo (Sirerol-Piquer *et al.* en revisión) de que la forma secretada de LGI1 es capaz de unirse a la membrana plasmática de células en cultivo. Además las formas mutadas de *LGI1* no llegan a secretarse a diferencia de la forma completa de *LGI1* (Senechal *et al.*, 2005) (Sirerol-Piquer *et al.* en revisión). Por lo tanto, podría ocurrir que la sobreexpresión de la forma mutada de *LGI1* en el ratón no tenga influencia alguna sobre su hipotético receptor ya que no llega a interactuar con él.

Recientemente se ha identificado el parólogo *LGI4* como el gen mutado en el ratón *claw paw* que presenta hipomielinización del sistema nervioso periférico sin signos de desmielinización en el SNC (Bermingham *et al.*, 2006). Este gen se ha relacionado con la formación de axones y mielina en el sistema nervioso periférico, lo que podría implicar a la familia de los genes LGI, o a parte de ella al menos, en la regulación de la mielinización y/o desmielinización del SN.

Las diferencias entre líneas constatadas en el análisis bidimensional de proteínas de cerebro podrían denotar un efecto dosis dependiente del transgén.

A fin de determinar si la sobreexpresión del transgén provocaba cambios en la expresión de genes del modelo, analizamos el proteoma de cada línea por separado. Utilizamos esta aproximación a fin de partir de un menor volumen de datos en comparación con los chips de expresión utilizados habitualmente. La hipótesis de trabajo fue que únicamente aquellos cambios más importantes serían detectables mediante esta técnica en contraposición con cambios más sutiles que serían detectados mediante el análisis del transcriptoma. Valiéndonos de la técnica basada en la electroforesis bidimensional, en este trabajo hemos constatado la posibilidad de la existencia de diferencias de expresión en proteínas de cerebro en los ratones

transgénicos. Si bien los dos análisis, el de la L15 y el de la L75, realizados señalaron en total 13 proteínas con diferencias significativas, sólo una de las proteínas coincidió en ambos análisis.

Esta variabilidad entre la L15 y la L75 también podría deberse a que los distintos niveles de sobreexpresión de *LGI1* influyen de forma diferente en la maquinaria del cerebro, sea por acumulación excesiva de proteína o por la función negativa de *LGI1*. Recuerdese que los pacientes de ADLTE mantienen una copia de *LGI1* intacta, luego o bien la disminución en el nivel de *LGI1* secretada (haploinsuficiencia) conlleva una disfunción o bien es la expresión de una forma mutada (dominancia negativa) la que crea la patología. De una u otra forma, a la luz de estos resultados, pero a la vez a la espera de un estudio de espectrometría de masas para la determinación de las proteínas expresadas diferentemente por los modelos, la dosis de expresión de *LGI1* podría ser clave en su función en relación con la ADLTE.

La sensibilidad a convulsivos como AK y PTZ no se ve alterado en nuestro modelo transgénico murino.

El sistema sináptico de señalización en el SN se puede dividir a gran escala en señal excitatoria e inhibitoria. El glutamato es el neurotransmisor más común de la vía excitatoria, mientras que en la señalización inhibitoria destaca el receptor del GABA (ácido γ -aminobutírico). Estos receptores son capaces de regular la transmisión de la información por lo que su alteración puede conllevar a grandes desórdenes por ejemplo de tipo epiléptico. Un incremento de la excitación o un detrimento de la inhibición son mecanismos ambos que pueden contribuir al proceso epiléptico.

Una posible causa del cambio de excitación es la alteración en receptores de glutamato. Se han constatado cambios en el nivel de estos receptores en pacientes epilépticos (Mathern *et al.*, 1998), si bien se desconoce si estos cambios son debidos a las crisis epilépticas o por lo contrario son la patología subyacente.

El receptor GABA_A es el que se encuentra mayormente implicado en la inhibición de la sinapsis rápida en el cerebro. Su implicación en el desarrollo epiléptico se sospechaba desde hacía tiempo, y de hecho, recientemente se encontró una mutación en la subunidad GABRA1 en una familia con un fenotipo consistente con la epilepsia mioclónica juvenil (JME) (Cossette *et al.*, 2002). También se han encontrado mutaciones en otro gen, CLC2 (Haug *et al.*, 2003), alteraciones que se cree disminuyan la corriente de cloro y por lo tanto tengan el mismo efecto que las mutaciones en

Discusión

GABRA1. Además, una de las dianas afectadas por los fármacos antiepilépticos son precisamente las sinapsis inhibitorias activadas por GABA.

Por todo ello, no es descabellado pensar que en nuestro modelo de ratón ADLTE esté afectado de algún modo una de estas dos rutas. AK (Sperk *et al.*, 1985; Babity *et al.*, 1997; Che *et al.*, 2001) y el PTZ (Zhao *et al.*, 2003; Tornberg *et al.*, 2005) son dos convulsivos utilizados comúnmente, los cuales actúan respectivamente sobre las dos rutas nombradas. El AK es un agonista del glutamato, mientras que el PTZ es un antagonista del GABA. El inicio de las crisis inducidas de esta forma, así como su severidad, se ven afectadas por varios factores una de las cuales es la dosis aplicada. Por ello mismo, a la misma dosis, el umbral de inducción debería de ser distinto cuando la ruta de acción se vea alterada. Sin embargo, nosotros no hemos observado ninguna variación significativa en el umbral de acción de los convulsivos AK y PTZ. . Lo cual indicaría que la acción de LGI1 no está relacionada con alteración de canales iónicos, y apoyaría la hipótesis de un mecanismo relacionado con la neurogénesis, migración neuronal y/o formación de redes neuronales.

Igi1 muestra un patrón mayormente restringido al SNC en el desarrollo embrionario de *Danio rerio*.

Hasta hace 9 años, el pez cebra fue simplemente un popular pez de peceras domésticas, pero su uso en la investigación ha ido incrementando según aparecían nuevas posibilidades de aplicación como es la generación de mutaciones para la obtención de información sobre la relación entre los genes y su función o el testado rápido de miles de fármacos en potencia y a bajo coste (Zon *et al.*, 2005). Si bien se desconoce exactamente hasta qué punto se puede aplicar el pez cebra como modelo de enfermedades humanas y hasta qué punto son fiables los resultados obtenidos en este vertebrado, los estudios más optimistas estiman una conservación de hasta un 95% (Milan *et al.*, 2003) en la respuesta a drogas entre células de mamífero y de pez cebra.

Por otra parte, el corto ciclo de vida, la alta tasa de reproductividad, el relativo reducido espacio necesario para mantener grandes números de ejemplares y la transparencia de los embriones, hacen de este animal un modelo vertebrado muy eficiente. Además, el interés científico de desarrollar un sistema modelo “simple” para el estudio del desarrollo y de enfermedades es substancial (Zon, 1999; Dooley *et al.*,

2000). Como vertebrado que es, el pez cebra está obviamente más cercanamente relacionado a los humanos que a otros organismos utilizados como la levadura, la lombriz o la mosca. De hecho, las funciones fisiológicas y el patrón de expresión de varios genes ortólogos entre humanos y el pez cebra se han conservado a un alto nivel, de forma que mutantes y *knockdowns* de los genes del pez cebra ortólogos de genes humanos causantes de enfermedades se han podido establecer como modelos de fenotipos humanos (Zon and Peterson, 2005).

Si bien aún queda mucho por descubrir en el pez cebra, se ha llegado a caracterizar numerosos aspectos del desarrollo del mismo, incluyendo el patrón del desarrollo temprano del embrión y el desarrollo temprano del SN.

En el momento en el que se realizaron los estudios con el pez cebra mostrados en este trabajo, las bases de datos describían un par de genes ortólogos de *LGI1*, *lgi1a* y *lgi1b*, localizados respectivamente en los cromosomas 13 y 12. No es raro encontrar esta duplicidad de genes en el pez cebra, explicada por las duplicaciones ancestrales a las que ha estado sujeto el genoma de estos vertebrados en los comienzos de la evolución (Lynch *et al.*, 2000).

Tras realizar un *blast* de la secuencia del clon con el que contábamos en las bases de datos del genoma del pez cebra, concluimos que se trataba de *lgi1a* por su mayor homología frente a *lgi1b*. El patrón de expresión de *lgi1* a lo largo del desarrollo embrionario podría alumbrar la función o actividad de este gen en el proceso del desarrollo. Hemos observado cómo *lgi1* se expresa tempranamente (nuestro primer dato es de 5 somitas) y de forma generalizada, restringiendo su patrón de expresión según avanza el desarrollo a la parte anterior del animal y por lo tanto al SNC. A las 24hpf las principales estructuras del cerebro en desarrollo se encuentran fuertemente marcadas, lo cual refuerza el papel de *lgi1* en el SNC.

Al término de este trabajo con *D. rerio*, Gu y colaboradores (Gu, Gibert *et al.*, 2005) describieron el patrón de expresión de la familia *lgi* en el pez cebra también por hibridación *in situ*. El patrón que obtienen en los embriones que analizan (20, 24 y 48hpf) es muy similar al que se muestra en la presente tesis. La expresión del tubo neural va disminuyendo con el desarrollo, mientras que la expresión de *lgi1a* es permanente en el cerebro y además a las 48hpf la expresión en la retina del ojo es muy destacable.

La inhibición de *LGII* en *Danio rerio* implica trastornos macroscópicos en el desarrollo embrionario.

Hasta el momento, los oligonucleótidos antisentido morfolino son la técnica de inactivación de genes en *D. rerio* preferida por ser la más rápida y fiable. Desde la primera publicación en el año 2000 (Nasevicius *et al.*, 2000) describiendo esta técnica, su uso se ha extendido ampliamente. Aún así, no está clara la forma de actuación de estos derivados de ribonucleósidos. Parece ser que no degradan sus moléculas dianas de ARN (tal como lo hacen otras estructuras antisentido como los siRNA (*small interfering RNA*)), sino que simplemente se hibridan a la secuencia complementaria y bloquean la interacción o acción del ARN diana

La forma más práctica de diseñar estos oligos es utilizando un sitio de procesamiento entre dos exones del gen como diana. Posteriormente, una RT-PCR será válida para la demostración y análisis de la inactivación del gen en los embriones microinyectados con el morfolino. Si se escoge como diana el primer codón de inicio de la transcripción, la validación será más compleja ya que requerirá de un ensayo de reticulocitos. Sin embargo, la diana del codón de inicio es más segura funcionalmente, ya que no es infrecuente encontrarse con reordenamientos y expresiones parciales del gen inactivado.

En nuestro caso, la inyección del morfolino de inicio resultó en una alteración del comportamiento de los embriones, que siendo morfológicamente normales, a menudo mostraron un patrón anómalo de movimientos rápidos y giros concéntricos alrededor de su mismo eje. El segundo morfolino utilizado, diseñado contra el sitio de procesamiento entre el exón 2 y el 3, no tuvo este mismo efecto. Sin embargo, hay que considerar que la validación de ambos morfolinos no ha sido posible.

Se han descrito en la literatura modelos de pez cebra de numerosas enfermedades del SN, entre ellas Alzheimer (Campbell *et al.*, 2006) o Ataxia-telangiectasia (Imamura *et al.*, 2005). Por otra parte, los estudios con modelos convulsivos de *D. rerio* (Baraban *et al.*, 2005) han demostrado ser válidos para el estudio de las bases de la generación de crisis y epileptogénesis. Igualmente es interesante el patrón de comportamiento que muestra el pez *c-bend* descrito por Lorent y colaboradores (Lorent *et al.*, 2001) y aislado por su defecto en la locomoción. Este mutante exhibe un patrón de escape anómalo ante un estímulo vibratorio, táctil o incluso espontáneamente, adoptando la forma de *C* (*c-bend*). Además, a menudo este giro incompleto se repite sucesivamente dando lugar a una rotación en circunferencia. Un estudio detallado a nivel celular ha revelado que este defecto motor se correlaciona con defectos axonales en una pequeña población de fibras neuronales del cerebro.

A la luz de otros ejemplos como los mencionados, el modelo de inhibición de *lgi1* mostrado en esta tesis bien merecería un estudio más a fondo y una búsqueda de la disfunción que subyace al patrón macroscópico anómalo, el cual podría tratarse de una desregulación o desorganización de los axones de las motoneuronas.

En este trabajo se describe por primera vez las consecuencias de la inactivación de *LGI1* en un sistema *in vivo*. Sería interesante contar con ensayos de inactivación de *Lgi1* en ratones, sea esta inactivación transitoria (por siRNA) o permanente con la creación de un *knockdown*. Seguramente sea más segura esta estrategia que la de un *knockout*, porque al igual que se ha demostrado la resistencia o no letalidad de la inhibición de *lgi1* en *D. rerio*, sería de esperar que ocurra lo mismo en el ratón, teniendo en cuenta que las técnicas mencionadas no eliminan por completo la expresión del gen diana sino que lo disminuyen en gran parte. En este sentido hay que señalar que en un trabajo reciente, Piepoli y colaboradores mencionan que sus intentos de obtener un *knock-out* para *lgi1* en ratón han resultado infructuosos (Piepoli *et al.*, 2006).

LGI1 requiere de una subunidad β para actuar sobre el canal de potasio Kv1.1.

En este trabajo se ha comentado cómo LGI1 no posee la estructura típica de un canal iónico, pero nunca se ha descartado la posibilidad de que interactúe con alguno. Recientemente Schulte y colaboradores (Schulte *et al.*, 2006) publicaron un trabajo en el que demuestran la interacción de LGI1 con un complejo proteico formado por las subunidades Kv1.1, Kv1.4 y Kv β 1 del canal de potasio dependiente de voltaje. Las subunidades Kv β 1 (las propiedades de Kv1.4 en este sentido han resultado ser inefectivas) confieren a este complejo la propiedad de inactivación de tipo N o rápida, característica de las corrientes de tipo A. Este mecanismo de inactivación se explica según el modelo de la “bola y la cadena” (Zagotta *et al.*, 1990) por el que los primeros 22 aminoácidos de cada uno de los 4 extremos N-terminales de las subunidades que forman el canal formarían una “bola de inactivación” que se une a través de una cadena de aminoácidos a un receptor cargado negativamente, localizado en la boca intracitoplasmática del canal, que puede ser ocupado tras la apertura del mismo, produciendo su rápida inactivación. Los autores de este trabajo sugieren que LGI1 afecta al canal formado por las subunidades Kv1.1, Kv1.4 y Kv β 1, impidiendo selectivamente el cierre del canal mediante la subunidad Kv β 1. Así mismo, observaron que construcciones mutadas de LGI1 son incapaces de

Discusión

ejercer este efecto, dejando operativas las subunidades β y por tanto generando canales con cinéticas de inactivación más rápidas.

Desde que en 1998 Smart et al (Smart *et al.*, 1998) demostraran que delecciones en el canal de potasio Kv1.1 causan epilepsia en el ratón, son numerosas las asociaciones de los distintos canales de potasio con epilepsia (Zuberi *et al.*, 1999).

Con esta información, es posible explicar por qué en los experimentos realizados con huevos de *Xenopus* no hemos podido detectar interacciones de LGI1 con Kv1.1. Es ahora obvio que en el sistema *in vitro* utilizado faltaba la subunidad β por la que LGI1 se asocia al canal.

En experimentos realizados con cultivos primarios de neuronas de ratón quisimos obtener un sistema más completo que el de los ovocitos de *Xenopus*, con el que de hecho hubiésemos podido detectar la interacción de LGI1 con el canal de potasio registrando las células previamente transformadas con LGI1. La técnica sin embargo no se pudo poner a punto. Así mismo, se intentó registrar células CHO (Chinese hamster ovary) transfectadas con canales de potasio y con LGI1, pero la alta variabilidad del sistema hizo imposible obtener ningún resultado.

Los canales de potasio dependientes de voltaje están formados por un tetrámero de subunidades α que forman el poro junto con subunidades β . Las variantes en las corrientes de potasio que se puedan encontrar son múltiples por la formación de heterómeros conteniendo dos o más subunidades α diferentes. En la propuesta de Schulte y cols., en la que LGI1 interacciona con un canal heterómero constituido por Kv1.1 y Kv1.4 junto con Kv β 1, a diferencia de la forma silvestre, los mutantes de *LGI1* ensayados no son funcionales y curiosamente, la coexpresión de LGI1 junto con formas mutadas tampoco lo es. Este modelo propuesto es consistente con el patrón de herencia autosómico dominante que presenta ADLTE y se podría explicar con el hecho de que cada una de las cuatro subunidades de Kv1.1 en un canal tetramérico une una subunidad β y una subunidad *LGI1*. Bajo estas condiciones, la presencia de una única subunidad mutada de LGI1 permitiría trabajar a su asociada subunidad β en la función de inactivación rápida del canal.

Será interesante comprobar en experimentos futuros si la isoforma procesada descrita por Morante-Redolat y cols. (Morante-Redolat *et al.*, 2002) actúa de la misma forma que las formas mutadas utilizadas por el grupo de Schulte, o por el contrario es eficaz en la ralentización de la inactivación rápida del canal de potasio.

Esta teoría del papel de las mutaciones de *LGI1* sobre el canal de potasio haría suponer que el ratón de sobreexpresión generado por nuestro laboratorio y descrito en este trabajo es un buen modelo de ADLTE, ya que la forma mutada de *LGI1* sobreexpresada en el ratón debería impedir la inhibición de la inactivación de Kv1.1 por la proteína endógena *LGI1* dada la elevada homología entre ambos ortólogos. Por otra parte, ADLTE es un síndrome benigno en el que las crisis epilépticas son escasas, por lo que no sería de extrañar que el fenotipo de nuestro modelo murino no se vea afectado y sea necesaria una caracterización histológica-citológica para poder ahondar en la implicación de *LGI1* en la transmisión del impulso nervioso.

Ambas hipótesis, la de *LGI1* interviniendo en plasticidad neuronal y la de *LGI1* mediando la inactivación de canales de potasio, no son excluyentes entre sí. *LGI1* podría ejercer funciones diferentes dependiendo del momento y del tejido de expresión, así como de su localización celular (secretada o retenida) o de la isoforma que se exprese. Un ejemplo de que incluso estas dos hipótesis podrían estar relacionadas de alguna forma es la asociación que Du-Yu Nie *et al.* (Nie *et al.*, 2003) describieron en 2003 entre el ligando de NogoR, Nogo-A, y la localización de los canales de potasio en los paranodos del SNC. Con nuevos descubrimientos y un análisis amplio de la literatura, próximamente asistiremos a explicaciones consistentes y robustas que sitúen el papel crucial de *LGI1* en la epileptogénesis y que puedan proporcionar información precisa para la producción y mejora de fármacos antiepilépticos.

Conclusiones

- 1) *LGI1* es el gen responsable de la Epilepsia Lateral Temporal Autosómica Dominante.
- 2) Los estudios genéticos de familias ADLTE apoyan que este síndrome sea genéticamente heterogéneo.
- 3) La ausencia de polimorfismos en la región promotora indica que probablemente anormalidades en el nivel de expresión de *LGI1* no estén relacionados con la ADLTE.
- 4) El ratón de sobreexpresión generado de la forma mutada 01 de *LGI1* presente en una familia ADLTE es un modelo válido para el estudio de la dominancia de las mutaciones en *LGI1*.
- 5) La sobreexpresión de *LGI1* mutado no tiene consecuencias clínicas en el ratón.
- 6) Todos los intentos fallidos de generar un ratón de sobreexpresión de *LGI1* en ratones apuntan hacia un efecto letal de éste en el desarrollo embrionario.
- 7) La inhibición de *LGI1* en el pez cebra conlleva trastornos motores que continúan siendo un enigma a nivel molecular.

Bibliografía

- Aloe L., Fiore M. *et al.* 1999. "Overexpression of tumour necrosis factor alpha in the brain of transgenic mice differentially alters nerve growth factor levels and choline acetyltransferase activity". **Cytokine** 11:45-54.
- Andermann F., Kobayashi E. *et al.* 2005. "Genetic focal epilepsies: state of the art and paths to the future". **Epilepsia** 46 Suppl 10:61-67.
- Ayerdi-Izquierdo A., Stavrides G. *et al.* 2006. "Genetic analysis of the LGI/Epitempin gene family in sporadic and familial lateral temporal lobe epilepsy". **Epilepsy Res.**
- Babbity J. M., Armstrong J. N. *et al.* 1997. "A novel seizure-induced synaptotagmin gene identified by differential display". **Proc Natl Acad Sci U S A** 94:2638-2641.
- Baraban S. C., Taylor M. R. *et al.* 2005. "Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression". **Neuroscience** 131:759-768.
- Barker P. A. 2004. "p75NTR is positively promiscuous: novel partners and new insights". **Neuron** 42:529-533.
- Barsi J. C., Rajendra R. *et al.* 2005. "Mind bomb1 is a ubiquitin ligase essential for mouse embryonic development and Notch signaling". **Mech Dev** 122:1106-1117.
- Beghi E., Berg A. *et al.* 2005. "Comment on epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)". **Epilepsia** 46:1698-1699; author reply 1701-1692.
- Berkovic S. F., Howell R. A. *et al.* 1998. "Epilepsies in twins: genetics of the major epilepsy syndromes". **Ann Neurol** 43:435-445.
- Berkovic S. F., Izzillo P. *et al.* 2004. "LGI1 mutations in temporal lobe epilepsies". **Neurology** 62:1115-1119.
- Berkovic S. F., McIntosh A. *et al.* 1996. "Familial temporal lobe epilepsy: a common disorder identified in twins". **Ann Neurol** 40:227-235.
- Berkovic S. F., and Scheffer I. E. 1999. "Genetics of the epilepsies". **Curr Opin Neurol** 12:177-182.
- Bermingham J. R., Jr., Shearin H. *et al.* 2006. "The claw paw mutation reveals a role for Lgi4 in peripheral nerve development". **Nat Neurosci** 9:76-84.

- Besleaga R., Montesinos-Rongen M. *et al.* 2003. "Expression of the LGI1 gene product in astrocytic gliomas: downregulation with malignant progression". **Virchows Arch** 443:561-564.
- Bigner S. H., and Vogelstein B. 1990. "Cytogenetics and molecular genetics of malignant gliomas and medulloblastoma". **Brain Pathol** 1:12-18.
- Bisulli F., Tinuper P. *et al.* 2002. "Partial epilepsy with prominent auditory symptoms not linked to chromosome 10q". **Epileptic Disord** 4:183-187.
- Blume W. T., Luders H. O. *et al.* 2001. "Glossary of descriptive terminology for ictal semiology: report of the ILAE task force on classification and terminology". **Epilepsia** 42:1212-1218.
- Boehnke M. 1986. "Estimating the power of a proposed linkage study: a practical computer simulation approach". **Am J Hum Genet** 39:513-527.
- Bothe G. W., Bolivar V. J. *et al.* 2004. "Genetic and behavioral differences among five inbred mouse strains commonly used in the production of transgenic and knockout mice". **Genes Brain Behav** 3:149-157.
- Brennan T. J., Seeley W. W. *et al.* 1997. "Sound-induced seizures in serotonin 5-HT_{2c} receptor mutant mice". **Nat Genet** 16:387-390.
- Brodtkorb E., Gu W. *et al.* 2002. "Familial temporal lobe epilepsy with aphasic seizures and linkage to chromosome 10q22-q24". **Epilepsia** 43:228-235.
- Buchanan S. G., and Gay N. J. 1996. "Structural and functional diversity in the leucine-rich repeat family of proteins". **Prog Biophys Mol Biol** 65:1-44.
- Campbell W. A., Yang H. *et al.* 2006. "Zebrafish lacking Alzheimer presenilin enhancer 2 (Pen-2) demonstrate excessive p53-dependent apoptosis and neuronal loss". **J Neurochem** 96:1423-1440.
- Campsall K. D., Mazerolle C. J. *et al.* 2002. "Characterization of transgene expression and Cre recombinase activity in a panel of Thy-1 promoter-Cre transgenic mice". **Dev Dyn** 224:135-143.
- Commission-on-Classification-and-Terminology-of-the-International, and League-Against-Epilepsy. 1981. "Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. " **Epilepsia** 22:489-501.

- Commission-on-Classification-and-Terminology-of-the-International-, and League-Against-Epilepsy. 1985. "Proposal for classification of epilepsies and epileptic syndromes." **Epilepsia** 26:268-278.
- Commission-on-Classification-and-Terminology-of-the-International-League-Against-Epilepsy. 1989. "Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes." **Epilepsia** 30:389-399.
- Cossette P., Liu L. *et al.* 2002. "Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy". **Nat Genet** 31:184-189.
- Cottingham R. W., Jr., Idury R. M. *et al.* 1993. "Faster sequential genetic linkage computations". **Am J Hum Genet** 53:252-263.
- Chan C. H., Briellmann R. S. *et al.* 2006. "Thalamic atrophy in childhood absence epilepsy". **Epilepsia** 47:399-405.
- Che Y., Yu Y. M. *et al.* 2001. "Delayed induction of p38 MAPKs in reactive astrocytes in the brain of mice after KA-induced seizure". **Brain Res Mol Brain Res** 94:157-165.
- Chernova O. B., Somerville R. P. *et al.* 1998. "A novel gene, LGI1, from 10q24 is rearranged and downregulated in malignant brain tumors". **Oncogene** 17:2873-2881.
- Deprez L., Claes L. R. *et al.* 2006. "Genome-wide linkage of febrile seizures and epilepsy to the FEB4 locus at 5q14.3-q23.1 and no MASS1 mutation". **Hum Genet** 118:618-625.
- Dib C., Faure S. *et al.* 1996. "A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites". **Nature** 380:152-154.
- Dooley K., and Zon L. I. 2000. "Zebrafish: a model system for the study of human disease". **Curr Opin Genet Dev** 10:252-256.
- Engel J., Jr. 2001. "A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology". **Epilepsia** 42:796-803.
- Engel T., Hernandez F. *et al.* 2006. "Full reversal of Alzheimer's disease-like phenotype in a mouse model with conditional overexpression of glycogen synthase kinase-3". **J Neurosci** 26:5083-5090.
- Fertig E., Lincoln A. *et al.* 2003. "Novel LGI1 mutation in a family with autosomal dominant partial epilepsy with auditory features". **Neurology** 60:1687-1690.

- Fisher R. S., van Emde Boas W. *et al.* 2005. "Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)". **Epilepsia** 46:470-472.
- Forsgren L., Beghi E. *et al.* 2005. "The epidemiology of epilepsy in Europe - a systematic review". **Eur J Neurol** 12:245-253.
- Gastaut H. 1970. "Clinical and electroencephalographical classification of epileptic seizures". **Epilepsia** 11:102-113.
- Gordon J. W., Chesa P. G. *et al.* 1987. "Regulation of Thy-1 gene expression in transgenic mice". **Cell** 50:445-452.
- Gu W., Brodtkorb E. *et al.* 2005. "LGI1: a gene involved in epileptogenesis and glioma progression?" **Neurogenetics** 6:59-66.
- Gu W., Brodtkorb E. *et al.* 2002. "LGI1 is mutated in familial temporal lobe epilepsy characterized by aphasic seizures". **Ann Neurol** 52:364-367.
- Gu W., Gibert Y. *et al.* 2005. "Using gene-history and expression analyses to assess the involvement of LGI genes in human disorders". **Mol Biol Evol** 22:2209-2216.
- Gu W., Sander T. *et al.* 2004. "Genotypic association of exonic LGI4 polymorphisms and childhood absence epilepsy". **Neurogenetics** 5:41-44.
- Gu W., Wevers A. *et al.* 2002. "The LGI1 gene involved in lateral temporal lobe epilepsy belongs to a new subfamily of leucine-rich repeat proteins". **FEBS Lett** 519:71-76.
- Gudín M., J.M. Serratos. 2000. "Síndromes epilépticos de base genética". **Avances en epileptología**:63-102.
- Haug K., Warnstedt M. *et al.* 2003. "Mutations in CLCN2 encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies". **Nat Genet** 33:527-532.
- Hauser W. A., Annegers J. F. *et al.* 1993. "Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984". **Epilepsia** 34:453-468.
- Hedera P., Abou-Khalil B. *et al.* 2004. "Autosomal dominant lateral temporal epilepsy: two families with novel mutations in the LGI1 gene". **Epilepsia** 45:218-222.

- Hoffman E. P. 1995. "Voltage-gated ion channelopathies: inherited disorders caused by abnormal sodium, chloride, and calcium regulation in skeletal muscle". **Annu Rev Med** 46:431-441.
- Imamura S., and Kishi S. 2005. "Molecular cloning and functional characterization of zebrafish ATM". **Int J Biochem Cell Biol** 37:1105-1116.
- Kahle P. J., Neumann M. *et al.* 2001. "Selective insolubility of alpha-synuclein in human Lewy body diseases is recapitulated in a transgenic mouse model". **Am J Pathol** 159:2215-2225.
- Kalachikov S., Evgrafov O. *et al.* 2002. "Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features". **Nat Genet** 30:335-341.
- Kobayashi E., Santos N. F. *et al.* 2003. "Magnetic resonance imaging abnormalities in familial temporal lobe epilepsy with auditory auras". **Arch Neurol** 60:1546-1551.
- Kollias G., Spanopoulou E. *et al.* 1987. "Differential regulation of a Thy-1 gene in transgenic mice". **Proc Natl Acad Sci U S A** 84:1492-1496.
- Krex D., Haues M. *et al.* 2002. "Physical and functional characterization of the human LGI1 gene and its possible role in glioma development". **Acta Neuropathol (Berl)** 103:255-266.
- Kullmann D. M. 2002. "Genetics of epilepsy". **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 73 Suppl 2:II32-35.
- Kunapuli P., Kasyapa C. S. *et al.* 2004. "LGI1, a putative tumor metastasis suppressor gene, controls in vitro invasiveness and expression of matrix metalloproteinases in glioma cells through the ERK1/2 pathway". **J Biol Chem** 279:23151-23157.
- Lathrop G. M., Lalouel J. M. *et al.* 1984. "Strategies for multilocus linkage analysis in humans". **Proc Natl Acad Sci U S A** 81:3443-3446.
- Lee Y., Barnes D. E. *et al.* 2000. "Defective neurogenesis resulting from DNA ligase IV deficiency requires Atm". **Genes Dev** 14:2576-2580.
- Lees G. V., Jones E. G. *et al.* 2000. "Epilepsy". **Neurobiol Dis** 7:549-551.
- Livak K. J., and Schmittgen T. D. 2001. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method". **Methods** 25:402-408.

- Lorent K., Liu K. S. *et al.* 2001. "The zebrafish space cadet gene controls axonal pathfinding of neurons that modulate fast turning movements". **Development** 128:2131-2142.
- Luders H., Acharya J. *et al.* 1998. "Semiological seizure classification". **Epilepsia** 39:1006-1013.
- Luthi A., Van der Putten H. *et al.* 1997. "Endogenous serine protease inhibitor modulates epileptic activity and hippocampal long-term potentiation". **J Neurosci** 17:4688-4699.
- Lynch M., and Conery J. S. 2000. "The evolutionary fate and consequences of duplicate genes". **Science** 290:1151-1155.
- Mathern G. W., Pretorius J. K. *et al.* 1998. "Altered hippocampal kainate-receptor mRNA levels in temporal lobe epilepsy patients". **Neurobiol Dis** 5:151-176.
- Mautner V. F., Lindenau M. *et al.* 2000. "Supporting evidence of a gene for partial epilepsy on 10q". **Neurogenetics** 3:31-34.
- Michelucci R., Passarelli D. *et al.* 2000. "Autosomal dominant partial epilepsy with auditory features: description of a new family". **Epilepsia** 41:967-970.
- Michelucci R., Poza J. J. *et al.* 2003. "Autosomal dominant lateral temporal epilepsy: clinical spectrum, new epitempin mutations, and genetic heterogeneity in seven European families". **Epilepsia** 44:1289-1297.
- Milan D. J., Peterson T. A. *et al.* 2003. "Drugs that induce repolarization abnormalities cause bradycardia in zebrafish". **Circulation** 107:1355-1358.
- Morante-Redolat J. M., Gorostidi-Pagola A. *et al.* 2002. "Mutations in the LGI1/Epitempin gene on 10q24 cause autosomal dominant lateral temporal epilepsy". **Hum Mol Genet** 11:1119-1128.
- Nakayama J., Fu Y. H. *et al.* 2002. "A nonsense mutation of the MASS1 gene in a family with febrile and afebrile seizures". **Ann Neurol** 52:654-657.
- Nakayama J., Hamano K. *et al.* 2003. "Mutation analysis of the leucine-rich, glioma inactivated 1 gene (LGI1) in Japanese febrile seizure patients". **Neuropediatrics** 34:234-236.
- Nasevicius A., and Ekker S. C. 2000. "Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish". **Nat Genet** 26:216-220.

- Nie D. Y., Zhou Z. H. *et al.* 2003. "Nogo-A at CNS paranodes is a ligand of Caspr: possible regulation of K(+) channel localization". **Embo J** 22:5666-5678.
- Ottman R. 2005. "Analysis of genetically complex epilepsies". **Epilepsia** 46 Suppl 10:7-14.
- Ottman R., Lee J. H. *et al.* 1998. "Are generalized and localization-related epilepsies genetically distinct?" **Arch Neurol** 55:339-344.
- Ottman R., Risch N. *et al.* 1995. "Localization of a gene for partial epilepsy to chromosome 10q". **Nat Genet** 10:56-60.
- Ottman R., Winawer M. R. *et al.* 2004. "LGI1 mutations in autosomal dominant partial epilepsy with auditory features". **Neurology** 62:1120-1126.
- Pato-Pato A., Cimas-Hernando I. *et al.* 2004. "[The economic impact of epilepsy]". **Rev Neurol** 39:450-453.
- Piepoli T., Jakupoglu C. *et al.* 2006. "Expression studies in gliomas and glial cells do not support a tumor suppressor role for LGI1". **Neuro-oncol** 8:96-108.
- Pisano T., Marini C. *et al.* 2005. "Abnormal phonologic processing in familial lateral temporal lobe epilepsy due to a new LGI1 mutation". **Epilepsia** 46:118-123.
- Ploughman L. M., and Boehnke M. 1989. "Estimating the power of a proposed linkage study for a complex genetic trait". **Am J Hum Genet** 44:543-551.
- Poza J. J., Saenz A. *et al.* 1999. "Autosomal dominant lateral temporal epilepsy: clinical and genetic study of a large Basque pedigree linked to chromosome 10q". **Ann Neurol** 45:182-188.
- Racine R. J. 1972. "Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure". **Electroencephalogr Clin Neurophysiol** 32:281-294.
- Reed P. W., Davies J. L. *et al.* 1994. "Chromosome-specific microsatellite sets for fluorescence-based, semi-automated genome mapping". **Nat Genet** 7:390-395.
- Risch N. J. 2000. "Searching for genetic determinants in the new millennium". **Nature** 405:847-856.
- Salas-Puig J., and Gil-Nagel A. 2004. "[Classification of epileptic seizures and syndromes: new proposals]". **Neurologia** 19:59-66.

- Scheel H., Tomiuk S. *et al.* 2002. "A common protein interaction domain links two recently identified epilepsy genes". **Hum Mol Genet** 11:1757-1762.
- Schulte U., Thumfart J. O. *et al.* 2006. "The epilepsy-linked Lgi1 protein assembles into presynaptic Kv1 channels and inhibits inactivation by Kvbeta1". **Neuron** 49:697-706.
- Senechal K. R., Thaller C. *et al.* 2005. "ADPEAF mutations reduce levels of secreted LGI1, a putative tumor suppressor protein linked to epilepsy". **Hum Mol Genet** 14:1613-1620.
- Skradski S. L., Clark A. M. *et al.* 2001. "A novel gene causing a mendelian audiogenic mouse epilepsy". **Neuron** 31:537-544.
- Skradski S. L., White H. S. *et al.* 1998. "Genetic mapping of a locus (mass1) causing audiogenic seizures in mice". **Genomics** 49:188-192.
- Smart S. L., Lopantsev V. *et al.* 1998. "Deletion of the K(V)1.1 potassium channel causes epilepsy in mice". **Neuron** 20:809-819.
- Sobel E., and Lange K. 1996. "Descent graphs in pedigree analysis: applications to haplotyping, location scores, and marker-sharing statistics". **Am J Hum Genet** 58:1323-1337.
- Somerville R. P., Chernova O. *et al.* 2000. "Identification of the promoter, genomic structure, and mouse ortholog of LGI1". **Mamm Genome** 11:622-627.
- Sperk G., Lassmann H. *et al.* 1985. "Kainic acid-induced seizures: dose-relationship of behavioural, neurochemical and histopathological changes". **Brain Res** 338:289-295.
- Staub E., Perez-Tur J. *et al.* 2002. "The novel EPTP repeat defines a superfamily of proteins implicated in epileptic disorders". **Trends Biochem Sci** 27:441-444.
- Stavnezer A. J., Hyde L. A. *et al.* 2002. "Differential learning strategies in spatial and nonspatial versions of the Morris water maze in the C57BL/6J inbred mouse strain". **Behav Brain Res** 133:261-270.
- Steinlein O. K. 2004. "Genetic mechanisms that underlie epilepsy". **Nat Rev Neurosci** 5:400-408.
- Steinlein O. K., Mulley J. C. *et al.* 1995. "A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy". **Nat Genet** 11:201-203.

- Suzuki T., Delgado-Escueta A. V. *et al.* 2004. "Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy". **Nat Genet** 36:842-849.
- Tan N. C., Mulley J. C. *et al.* 2004. "Genetic association studies in epilepsy: "the truth is out there"". **Epilepsia** 45:1429-1442.
- Tornberg J., Voikar V. *et al.* 2005. "Behavioural phenotypes of hypomorphic KCC2-deficient mice". **Eur J Neurosci** 21:1327-1337.
- Turnbull J., Lohi H. *et al.* 2005. "Sacred disease secrets revealed: the genetics of human epilepsy". **Hum Mol Genet** 14:2491-2500.
- Van der Putten H., Wiederhold K. H. *et al.* 2000. "Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein". **J Neurosci** 20:6021-6029.
- Vidal M., Morris R. *et al.* 1990. "Tissue-specific control elements of the Thy-1 gene". **Embo J** 9:833-840.
- Wallace R. H., Izzillo P. *et al.* 2002. "Mutations in LGI1 in an Australian family with familial temporal epilepsy with auditory features [abstract]". **Am J Hum Genet** 71:s472.
- Weeks D. E., Sobel E. *et al.* 1995. "Computer programs for multilocus haplotyping of general pedigrees". **Am J Hum Genet** 56:1506-1507.
- Winawer M. R., Martinelli Boneschi F. *et al.* 2002. "Four new families with autosomal dominant partial epilepsy with auditory features: clinical description and linkage to chromosome 10q24". **Epilepsia** 43:60-67.
- Winawer M. R., Ottman R. *et al.* 2000. "Autosomal dominant partial epilepsy with auditory features: defining the phenotype". **Neurology** 54:2173-2176.
- Zagotta W. N., Hoshi T. *et al.* 1990. "Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB". **Science** 250:568-571.
- Zhao W. J., Ma Y. H. *et al.* 2003. "Increase in drug-induced seizure susceptibility of transgenic mice overexpressing GABA transporter-1". **Acta Pharmacol Sin** 24:991-995.
- Zon L. I. 1999. "Zebrafish: a new model for human disease". **Genome Res** 9:99-100.
- Zon L. I., and Peterson R. T. 2005. "In vivo drug discovery in the zebrafish". **Nat Rev Drug Discov** 4:35-44.

Bibliografia

- Zuberi S. M., Eunson L. H. *et al.* 1999. "A novel mutation in the human voltage-gated potassium channel gene (Kv1.1) associates with episodic ataxia type 1 and sometimes with partial epilepsy". **Brain** 122 (Pt 5):817-825.